

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“PROTEÓMICA DE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS Y
CARACTERIZADAS DE ZONAS IMPACTADAS POR LA ACTIVIDAD
MINERA AURÍFERA DEL PROYECTO YERBA BUENA, LA LIBERTAD”.**

PRESENTADA POR:

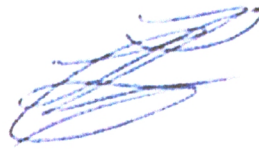
Br. CARLOS ENRIQUE CUBAS ZÚÑIGA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

Piura – Perú

2018

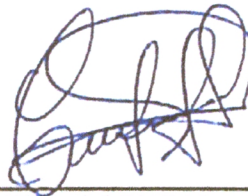
**Tesis presentada como requisito para optar al título de
BIÓLOGO**



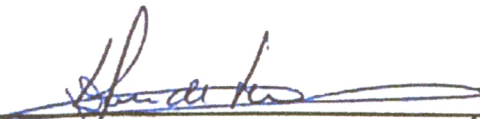
**Br. CARLOS ENRIQUE CUBAS ZÚÑIGA
AUTOR**



**Blgo - Mcblgo. CÉSAR TORRES DÍAZ M.Sc.
ASESOR**



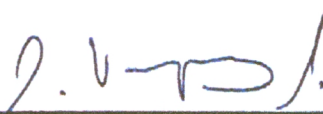
**Blgo. MELITZA CORNEJO LA TORRE M. Sc.
COASESORA**



**Blgo - Mcblgo DOROTHY TORRES DE LEÓN M.Sc.
PRESIDENTE**



**Blgo - Mcblgo JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE M.Sc.
SECRETARIO**



**Dr. ALEJANDRO VÁSQUEZ ARRIETA
VOCAL**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 042-2018-D-FC-UNP

Los Miembros del Jurado-Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada **"PROTEÓMICA DE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS Y CARACTERIZADAS DE ZONAS IMPACTADAS POR LA ACTIVIDAD MINERA AURÍFERA DEL PROYECTO YERBA BUENA, LA LIBERTAD"** presentada por el señor Bachiller **CARLOS ENRIQUE CUBAS ZÚÑIGA**, con el asesoramiento de la **McBLGO. César Augusto Torres Díaz, M.Sc**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

APROBADO (X)

DESAPROBADO ()

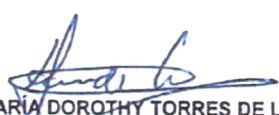
Con la mención de:


MOY BUENA

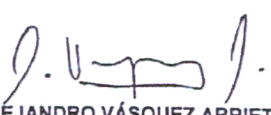
☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura 20 de julio 2018.


McBlgo. **MARÍA DOROTHY TORRES DE LEÓN, M.Sc.**
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS


McBlgo. **JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE, M.Sc.**
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS


Ing. **ALEJANDRO VÁSQUEZ ARRIETA, M.Sc.**
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA - PERÚ

Scanned by CamScanner

“Aprender a conocer, Aprender a hacer, Aprender a vivir juntos, aprender a vivir con los demás, Aprender a ser” - Jacques Delors

DEDICATORIA

Esta investigación esta dedicada a mi familia la cual es mi principal motor en todo en mi vida, y especialmente a mi hermana Ana Lucia a la cual siempre tengo presente.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Área de ejecución del estudio:	16
Muestras de estudio	16
Preparación de la muestra	16
Extracción de proteínas celulares y exoproteoma	16
Extracción de proteínas celulares:	16
Análisis del exoproteoma bacteriano	17
Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE	17
Preparación del gel de Poliacrilamida:	17
Cargado y corrida de las muestras	17
Fijación de las proteínas en el gel de poliacrilamida	18
Tinción y decoloración del gel de poliacrilamida	18
Digestión del gel	18
Saturación de la pieza del gel con buffer tripsina	18
Digestión de las proteínas en la pieza de gel	19
Extracción de péptidos producto de la digestión	19
Digestión en solución:	19
Cromatografía de columna por ZIP-TIC C-18 para extracción de Exoproteoma	19
Análisis espectrométrico de las proteínas recuperadas	20
Preparación de matriz	20
Preparación de las muestras para el análisis pro MS	20
Análisis por MS	20
Identificación de proteínas:	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	49

RESUMEN

Los microorganismo y principalmente las bacterias tienen un gran potencial para la biodegradación de contaminantes, entre ellos el cianuro, el cual es un compuesto extremadamente tóxico para los organismos vivos y por lo tanto para los ecosistemas. Bacterias nativas aisladas de zonas contaminadas con cianuro, con capacidad de biodegradar este contaminante, fueron analizadas a nivel proteómico mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF, se reportó una mayor cantidad y diversidad de proteínas involucradas en la degradación de cianuro cuando las bacterias crecieron en medio mínimo M9 con una concentración de 50 ppm de cianuro de sodio como única fuente de nitrógeno. El enfoque proteómico mediante MALDI TOF/ TOF logró identificar de forma rápida y precisa el perfil proteómico de las bacterias evaluadas, posicionando esta técnica de vanguardia como una de las mejores para el análisis e identificación de microorganismos potencialmente biorremediadores de contaminantes.

Palabras claves: Proteomica, MALDI TOF TOF, Bacterias, Cianuro.

ABSTRACT

Microorganisms and mainly bacteria have great potential for the biodegradation of pollutants, including cyanide, which is an extremely toxic compound for living organisms and the same for ecosystems. Native bacteria isolated from areas contaminated with cancer, with the capacity to biodegrade this contaminant, were analyzed at the proteomic level by MALDI TOF / TOF mass spectrometry, a greater amount and diversity of proteins involved in the degradation of cyanide was reported when the bacteria grew in M9 minimum medium with a 50 ppm concentration of sodium cyanide as the sole nitrogen source. The proteomic approach using MALDI TOF / TOF was able to quickly identify and specify the proteomic profile of the evaluated bacteria, positioning this state-of-the-art technique as a tool for the analysis and identification of microorganisms potentially bioremediating contaminants.

Keywords: Proteomic, MALDI TOF TOF, Bacteria, Cyanide.

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país predominantemente minero y goza de un inmenso potencial geológico, albergando varios de los principales proyectos y minas más importantes del mundo. Actualmente, ocupa el segundo lugar en producción de cobre, plata y zinc a nivel mundial y se ubica como primer productor de oro, plomo y zinc en Latinoamérica. En esa línea, los esfuerzos del Estado están comprometidos con promover una minería moderna, social y ambientalmente responsable que contribuya con el desarrollo sostenible del país. La minería constituye uno de los principales pilares de la economía peruana y un motor de crecimiento y desarrollo que ha permitido generar bienestar en la población, contribuyendo a la reducción de la pobreza. En el 2017, la minería representó alrededor del 10% del PBI nacional y cerca del 62% del valor total de las exportaciones peruanas, convirtiéndose en la fuente más importante de divisas de nuestro país (Cuadra, y otros, 2017).

Durante la práctica minera, se usa cianuro para la extracción de oro, plata y otros metales a partir de minerales, procesos que son considerados como los mayores productores de aguas residuales que contienen cianuro. Estos residuos líquidos también contienen metales pesados y metaloides que incrementan su toxicidad. En estos residuos industriales el cianuro puede encontrarse no solo como iones libres (CN^-) sino también como complejos cianuro-metal, ya que el cianuro se une fuertemente a metales (Luque-Almagro, y otros, 2015).

La toxicidad de las diferentes especies de cianuro depende de su forma química, de su estabilidad y de su biodisponibilidad, siendo la forma más tóxica el cianuro libre (HCN y CN^-), y las menos, los complejos cianuro-metálicos fuertes. El ión

cianuro es un potente inhibidor del metabolismo celular, afectando principalmente a la respiración celular y al metabolismo del nitrógeno y del fosfato. La toxicidad del cianuro se debe principalmente a su elevada afinidad por metales, lo que ocasiona su unión a los cofactores metálicos de las metaloenzimas y, en último término, su inhibición. Entre las principales metaloenzimas inhibidas por el cianuro se encuentra la citocromo c oxidasa, enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial. La inhibición de esta enzima bloquea la fosforilación oxidativa disminuyendo la concentración de ATP en la célula y provocando la muerte celular (Dubey & Holmes, 1995).

Existen muchos antecedentes a nivel mundial sobre la biorremediación de cianuro y sus derivados, los cuales han venido evolucionando y beneficiándose gracias al progreso de la biología y biotecnología. Sin embargo en Perú es muy poco explorado este campo, y mucho menos implementado las tecnologías y el método biológico de remediación de cianuro.

Gantzer y Maier en 1988 mostraron la habilidad de *Anabaena*, una cianobacteria fijadora de nitrógeno, para degradar el cianuro, observando principalmente que las tasas de degradación del cianuro están relacionadas directamente con los valores de pH de los ensayos.

Se han llevado a cabo demostraciones a escala de laboratorio de la biodegradación de cianuro. Sin embargo, la única planta de biodegradación de cianuro a escala comercial en América del Norte (y tal vez en el mundo) se encuentra en la Mina Homestake cerca de Lead, Dakota del Sur. El proceso y la economía de este proceso biológico desarrollado por Mudder & Whitlock (1984) se han comparado con el tratamiento convencional con H_2O_2 catalizado por cobre (Dubey & Holmes, 1995).

Otros ejemplos de la aplicación práctica de microorganismos degradadores de cianuro son el uso de *Acinefobacter* RFB 1 en la separación de oro de otros complejos de cianuro metálico en efluyentes mineros (Finnegan, Torien, Abbot, & Raubenheimer, 1991) y el uso de cultivos puros de *P. aeruginosa*, aislada mediante técnicas de cultivo de enriquecimiento, para mejorar los aceites de esquisto mediante la eliminación selectiva de una serie de nitrilos (Aislabie & Atlas, 1989) (Dubey & Holmes, 1995).

Kunz et al. en 1992 emplearon la cepa *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 para la degradación de cianuro de potasio (KCN) con la formación de productos menos contaminantes como CO₂, amonio, formamidas y formiatos en proporciones dependientes de las concentraciones iniciales de KCN (Cornejo-La torre, y otros, 2017).

En los últimos años se están llevando a cabo estudios de biodegradación de cianuro a escala de laboratorio, utilizando técnicas de cultivo continuo en biorreactores, con aguas residuales cianuradas de las industrias de gasificación del carbón, alimentaria (de la yuca), siderúrgica y minera (). Los microorganismos utilizados en estos tratamientos suelen ser cultivos puros, aunque también existen estudios llevados a cabo con poblaciones mixtas que actúan de forma comensal (Potivichayanon, Supromin, & Toensakes, 2017).

Existen cuatro vías generales para la biodegradación del cianuro: hidrolítica; oxidativa; reductiva; y sustitución/adición. Varios trabajos describen estas vías y los organismos en que se encuentran. Sin embargo, organismos adicionales con la capacidad para biodegradar cianuro siguen siendo reportados (Ebbs, 2004). El cianuro es convertido en fuentes de carbono y nitrógeno mediante varias enzimas presentes en microorganismos. Las vías metabólicas para la conversión

de cianuro están influenciadas por su concentración inicial, pH, temperatura, disponibilidad de otras fuentes de energía en la forma de carbono requerido para el mantenimiento de la célula y el crecimiento, presencia de oxígeno, amoníaco y varios iones metálicos (Gupta, Balomajumder, & Agarwal, 2010).

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes y están presentes en todas las células y en todas las partes de las mismas. Las proteínas también presentan una gran variedad; en una sola célula se pueden encontrar miles de clases de proteínas diferentes, que varían en tamaño desde péptidos relativamente pequeños hasta polímeros enormes de masa molecular del orden de millones. Además, las proteínas muestran una gran diversidad en cuanto a su función biológica y son los productos finales más importantes de las rutas de información. Entre los productos proteicos, las enzimas son los más variados y especializados. Prácticamente todas las reacciones celulares están catalizadas por enzimas (Nelson & Cox, 2005).

Las proteínas extracelulares están sujetas a un intenso interés debido a sus esenciales roles en los estilos de vida bacterianos. Las proteínas secretadas (ejemplo. Las enzimas degradativas en bacterias saprofitas o factores de virulencia en bacterias patógenas) son las principales herramientas que usa la bacteria para interactuar con su ambiente. Debido a estos roles funcionales, las proteínas secretadas ofrecen potenciales beneficios en la biorremediación (Desvaux, Hébraud, Talon, & Henderson, 2009).

El término 'exoproteoma' describen las proteínas contenidas que pueden ser encontradas en la proximidad extracelular de un sistema celular. Estas proteínas surgen de la secreción bacteriana, otros mecanismos exportadores de proteínas o lisis celular, pero solo las proteínas más estables en el ambiente permanecerán

El Espectrometro de masas (MS) es una herramienta analítica para medir las proporciones masa/carga (m/z) de iones en orden para determinar su peso molecular (MW). Este proceso envuelve tres pasos: i) conversión de moléculas a iones en fase gaseosa por la fuente de ionización; ii) separación de iones por sus valores de m/z vía magnética o campos eléctricos mediante un componente, es decir un analizador de masas; iii) detección de los iones separados por carga eléctrica obteniendo señales proporcional a la abundancia de cada especie. En muchas configuraciones, análisis de MS tándem adicional (MS/MS) son factibles. En el modo MS/MS, el instrumento utiliza el primer analizador de masas para seleccionar un solo ion que es posteriormente disparado en una celda de colisión, donde choca con las moléculas de gas como el argón causando la fragmentación del ion. Los múltiples fragmentos de iones se analizan entonces en la segunda etapa del analizador de masas dando información precisa sobre características estructurales de los iones primarios (Di Girolamo, Lante, Maurizio, & Putignami, 2013).

MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) es una tecnología muy utilizada en proteómica para la identificación de proteínas, la más sensible que otras técnicas de ionización laser. Ciertamente, el número de las moléculas de la matriz excede ampliamente a las del analito, separando así las moléculas de analito y evitando de este modo la formación de conglomerados de la muestra que inhiben la aparición de iones moléculas. La matriz también minimiza el daño a la muestra del pulso de laser mediante la absorción de la mayor parte de la energía incidente y aumenta la eficiencia de la transferencia de energía del láser al analito. Así que la sensibilidad es también altamente incrementada (Hoffmann & Stroobant, 2007). El MALDI es también más universal que las otras técnicas

de ionización láser. De hecho, no es necesario ajustar la longitud de onda para que coincida con la frecuencia de absorción de cada analito porque es la matriz que absorbe el pulso de láser. Además, debido a que el proceso es independiente de las propiedades de absorción y el tamaño del compuesto a analizar, el MALDI permite la desorción e ionización de analitos con una muy alta masa molecular de más de 100 000 Da. Por ejemplo, el MALDI permite la detección de femtomoles de proteínas de masa molecular de hasta 300 000 Da (Karas & Hillenkamp, 1988) (Spengler & Cotter, 1990).

Esta investigación tuvo como objetivo identificar y caracterizar las proteínas de interés para la biorremediación de cianuro, en bacterias nativas aisladas y caracterizadas de pozas lixiviación artesanales presentes en zonas impactadas por la actividad minera aurífera del proyecto Yerba Buena, La Libertad.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Área de ejecución del estudio:

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de la empresa INCA'BIOTEC S.A.C. y la Universidad Nacional de Tumbes, ubicados en la ciudad de Tumbes-Perú.

2.2. Muestras de estudio

Treinta y dos bacterias fueron empleadas para el desarrollo de la presente investigación. Las cepas bacterianas identificadas molecularmente, fueron proporcionadas del cepario de la investigación de Cornejo-Latorre, y otros, 2017; las que fueron aisladas de aguas y suelos residuales de procesos de lixiviación con cianuro, de minas auríferas artesanales en el cerro Urcopongo, Otuzco, La Libertad, Perú.

La lista de bacterias utilizadas para esta investigación figuran en el anexo 01.

2.3. Preparación de la muestra

Las bacterias agrupadas en tres géneros *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Pseudomonas* fueron cultivadas en caldo Luria-Bertani (control) y en medio mínimo M9 con 50 ppm de concentración de cianuro (medio de expresión), las muestras se incubaron por 24 y 48 horas respectivamente a temperatura ambiente, con agitación (150 rpm) y evaluadas diariamente (anexo 02 y 03).

2.4. Extracción de proteínas celulares y exoproteoma

2.4.1. Extracción de proteínas celulares:

Se realizó empleando el Qproteome Bacterial Protein Prep Kit (QIAGEN KIT, 2011) siguiendo el protocolo del fabricante, para lo cual, se centrifugaron los microtubos de 1.5 mL con los cultivos bacterianos a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se congeló durante 15 minutos a -20°C. El pellet fue descongelado y se adicionó 100 µL de buffer nativo de lisis, fue sonificado por 5 minutos e incubado en hielo (-4°C) por 30 minutos. Se

homogenizó por inversión suavemente cada 10 minutos, fue centrifugado a 14 000 rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante contuvo la fracción soluble de la proteína de la célula bacteriana.

2.4.2. Análisis del exoproteoma bacteriano

Para el análisis del exoproteoma se realizó siguiendo el siguiente protocolo. Se centrifugaron los microtubos a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C, luego se filtró el sobrenadante empleando filtros de 0.22 µm de tamaño de poro y se colocó 500 µL en un nuevo microtubo. Se agregaron 2 volúmenes de acetona helada por cada volumen de muestra y se incubó a -20°C por 12 horas. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4°C y fue el sobrenadante fue eliminado. Los pellets fueron secados en bomba al vacío durante 30 minutos. Se resuspendió el pellet en 80µL de agua grado HPLC con 0.1% TFA y se almacenó a -20°C para futuros análisis. Otros protocolos ver anexos 04-07

2.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

2.5.1. Preparación del gel de Poliacrilamida.

La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE fue desarrollada de acuerdo al método de Laemmli (1970), para lo cual se preparó 15 mL del gel de migración al 10% y 12%; 5 mL de la solución del gel concentrador al 4% (anexo 08).

2.5.2. Cargado y corrida de las muestras.

30 µL de muestra de proteínas fue mezclada con un volumen de 20 µL de buffer de muestra (Tris HCl 0,09M pH 6,8; SDS 2%; Glicerol 20%; DTT 0,1M y azul de bromofenol 0,025%) en tubo Eppendorf de 0,2ml; la mezcla fue calentada por 5 minutos a 95°C con ayuda de un baño seco, pasado este tiempo las muestras fueron cargadas en los hoyos del gel preparado anteriormente. Las muestras se

corrieron a 90V hasta que el azul de Bromofenol llegue al borde inferior del gel, el cual duró aproximadamente 2 horas.

2.5.3. Fijación de las proteínas en el gel de poliacrilamida

Terminado el tiempo de corrida el gel fue sacado de la cámara de migración y se colocó en un recipiente conteniendo una solución fijadora (Metanol/Ácido Acético) durante 15 minutos en un recipiente tapado, con agitación suave.

2.5.4. Tinción y decoloración del gel de poliacrilamida

Luego del proceso de fijación el gel fue teñido con 100 mL de azul de Coomassie R-250 por 6 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución de coloración y se pasó a decolorar el gel con solución de decoloración (etanol 45%, ácido acético 10% y agua destilada). Las bandas observadas fueron recortarlas y colocadas en microtubos de 0.2 mL (Lomonte, 2007).

2.6. Digestión del gel

Protocolo de decoloración de las bandas de gel teñidas con azul de Coomassie según (Shevchenko, Tomas, Havlis, Olsen, & Mann, 2007). Para lo cual se agregó 100 μ L de la solución de 100 mM de Bicarbonato de amonio/acetonitrilo (v/v) en los microtubos de 0.2 ml que contienen las bandas recortadas. Se incubó durante 30 min vortexiando ocasionalmente a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante quedando solo la pieza de gel y fue agregado 500 μ L de acetonitrilo e incubado a temperatura ambiente vortexiando ocasionalmente hasta que la pieza de gel se torne de color blanco y se encoja. Se eliminó el acetonitrilo.

2.7. Saturación de la pieza del gel con buffer tripsina.

Se agregó 25 μ L de buffer tripsina hasta cubrir la pieza de gel por completo, luego fue incubado por 120 minutos sobre hielo (nevera -4°C) observando a los 30 minutos si la pieza de gel ha absorbido el buffer de tripsina. Si absorbe se agrega más buffer de tripsina hasta cubrir la pieza de gel completamente.

2.8. Digestión de las proteínas en la pieza de gel.

Pasado los 120 minutos, se incubó las piezas de gel a 37°C por 12 horas o a 55°C durante 30 minutos. Terminado el proceso de digestión se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 minuto, se sacó una alícuota de 2 µL y fue espoteada sobre la placa Maldi con matriz CHCA (v/v) (alfa-cyano-4 hidroxycinnamic acid) 10 mg/ml (v/v).

2.9. Extracción de péptidos producto de la digestión.

Se agregó 50 µL de buffer de extracción (5% de ácido fórmico/acetonitrilo) (1:2 v/v), fue incubado el microtubo a 37°C por 15 minutos. Se vortexió durante 30 minutos y fue sonicado durante 5 minutos, posteriormente se sacó una alícuota de 10 µL y fue secada en bomba al vacío hasta dejar el contenido del microtubo de 0.2 µL seco por completo. Se resuspendió en 3 µL de agua HPLC con 0.1% TFA y espoteado sobre la placa Maldi con matriz CHCA (v/v) (alfa-cyano-4 hidroxycinnamic acid) 10 mg/ml (v/v).

2.10. Digestión en solución:

Se tomó alícuota de 10 µL de la muestra de exoproteoma de las bacterias, en un microtubo de 0.2 mL se agregó la alícuota de 10 µL, 15 µL de buffer de digestión, 1,5 µL de buffer de reducción (DTT) y se ajusta el volumen a 27 µL con AUP. Se incubó en termobloque a 95°C por 5 min luego se dejó enfriar la muestra, Los microtubos se forraron con papel aluminio, se adicionó 3 µL de buffer de alquilación e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 20', se adicionó 1 µL de tripsina solución 0.1 µg/µL y fue incubado a 37°C por 3 horas, luego se agregó 1 µL de tripsina y fue incubado a 37°C por 12 horas, finalmente se detuvo la digestión con 5 µL TFA 20%.

2.11. Cromatografía de columna por ZIP-TIC C-18 para extracción de Exoproteoma.

Este procedimiento fue desarrollado siguiendo el protocolo de fábrica de las columnas Millipore® C18 en busca de purificar y fraccionar las proteínas de bajo peso molecular (anexo 09).

2.12. Análisis espectrométrico de las proteínas recuperadas

2.12.1. Preparación de matriz

La matriz empleada para el análisis espectrométrico fue ácido α -Ciano-4-hidroxicinnámico (CHCA) 10 mg/ml (0.1% TFA agua HPLC 500 μ L y 0.1% TFA en ACN 500 μ L). La matriz fue disuelta en un volumen de solvente apropiado para lograr la necesaria concentración de la matriz. Se llevó a sonicación durante aproximadamente 1 minuto o hasta que disuelva por completo y posteriormente se centrifugó durante 30 segundos, la matriz preparada fue conservada a -20°C hasta el momento del análisis. Las matrices fueron preparadas semanalmente.

2.12.2. Preparación de las muestras para el análisis pro MS

Después de la digestión se tomó 1,5 μ l de la muestra de proteínas y se mezcló con 1,5 μ l de matriz homogeneizando minuciosamente, 1 μ l de la mezcla fue colocada en el spot de la placa Opti-TOF®. La placa fue colocada en el espectrómetro de masas.

2.12.3. Análisis por MS

El análisis por espectrometría de masas se desarrolló usando el equipo MALDI TOF/TOF 5800. Los espectros fueron captados en modo MS Reflector Positivo con un láser Nd:YAG de 335nm de longitud de onda, los espectros se obtuvieron con 500 disparos de láser con un potencial de 3000 unidades internas de intensidad de láser. Para el análisis de fragmentos de iones en modo de tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), se aceleraron los precursores a 8kV y se seleccionaron en la puerta de entrada de iones.

Además, los fragmentos generados por colisión de los precursores con aire en la cámara de disociación inducida por colisión (CID) se aceleraron a 15kV en la fuente 2 y se analizaron sus masas después de pasar por el reflector de iones.

El análisis automático de los datos se realizó usando el programa informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (Applied Biosystem).

2.12.4. Identificación de proteínas:

Los datos MS y MS/MS fueron combinados mediante la búsqueda en el software ProteinPilot™ Software 4.0 con ayuda del Paragon™ algoritmo (Matrix Science, Boston, MA) usando el GPS Explorer software, Versión 3.6 que permite la búsqueda no redundante. Los datos obtenidos fueron contrastados contra de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

3. RESULTADOS

Figura 01. Migración de proteínas en SDS-PAGE 10%, perfil de proteínas de Alcalígenes (A), Bacillus (B), Pseudomonas (P). Control (C). Las bacterias fueron cultivadas en M9 con 50 ppm de NaCN.

Se observan bandas intensas correspondientes a las proteínas intracelulares de las bacterias de los géneros Alcalígenes, Bacillus y Pseudomonas migradas por triplicado en un gel de poliacrilamida, las proteínas se ubican de acuerdo a su peso molecular, las de mayor tamaño migran menos que las más pequeñas. Las bandas son recortadas para luego ser procesadas y finalmente analizadas en el espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF.

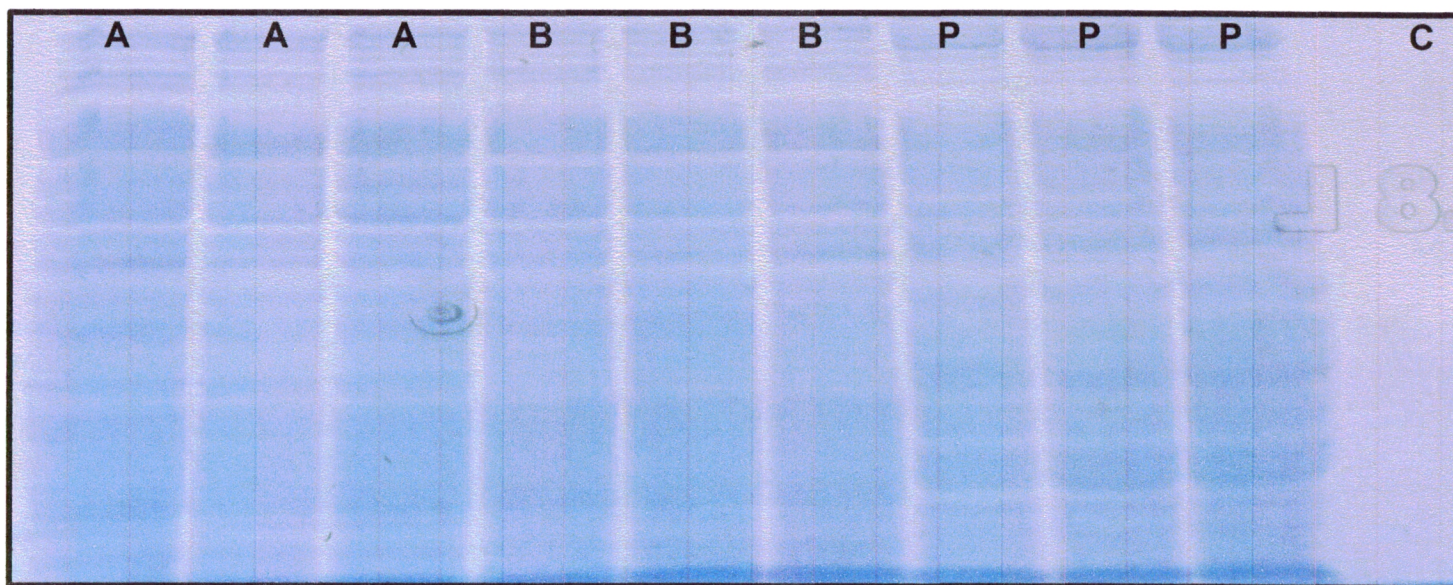


Tabla 01. Resultados de los análisis realizados en el MALDI TOF-TOF a las bacterias cultivadas en M9 con 50 ppm de NaCN.

Esta tabla muestra las mejores secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas identificadas en el programa bioinformático ProteinPilot y contrastadas en el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Las proteínas identificadas están directa o indirectamente relacionadas con el metabolismo del cianuro y sus derivados

Prec MW	Mejor Secuencia	Theor MW	Proteína	G
1055.5737	VKEARRGAR	1055.6312	Thiocyanate hydrolase	A
1779.8877	TAAERAAQLELVARLR	1780.0067	Nitrilase	A
1946.9467	LELDNDAILLLQTIPLR	1947.1041	Cyanase	A
1430.7457	AQLTEKLVDLKR	1430.7915	Cyanase	A
1779.8877	PFISKREAAEHIRVAR	1779.9744	Cyanase	A
1114.4967	SANRWPGPSR	1114.5302	Cyanase	A
1946.9467	PAFYLPMTAMLLALILR	1947.1267	Cytochrome D ubiquinol oxidase	A
1500.6797	VTRLEQENRSLR	1500.8009	Nitric oxide reductase transcription regulator	A
2728.2927	QAMHWLAASNPLDFLGALLSAGSDAR	2728.3279	Carbon-nitrogen hydrolase	A
1089.5366	DRAAVLIDSR	1089.5488	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	A
1055.5737	KVLDARGAAR	1055.62	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	A
1430.7457	GADGRFLPSDQLR	1430.7267	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	A
1596.9266	VLDGGLPKWRAEAR	1596.8737	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	A
1203.6107	VPFVQQDWGL	1203.5924	Thiosulfate sulfurtransferase	A
1089.5366	KEVPIFDSR	1089.5819	Nitrilase	A
1055.5737	VQVPGKTTAR	1055.6088	Nitrilase	A
2447.3167	ITTNRASVKARNARLPGADGGAPR	2447.3582	Nitrilase	A
2854.2327	RMMDSVGHYARPELLSLRLDTPAR	2854.4509	Nitrilase	A

1590.8287	SHDVGANASAHAEAVR	1590.7499	Nitrilase	B
1703.8217	GADVILVPAYWGKQR	1703.8995	Nitrilase	B
1069.4597	MVWGFGDAR	1069.4651	Nitrilase	B
1838.8226	KMFLGGAEPHRMRPGR	1838.9508	Nitrilase	B
1807.0397	AGIAVCYDSEFPLPVR	1806.8975	Carbon-nitrogen hydrolase	B
1892.9116	QNFDVAGHYSRPDITR	1892.8588	Carbon-nitrogen hydrolase	B
3319.4546	FAAMEARCYVVSASALLRPEDIGPDFPLR	3319.6482	Nitrilase	B
1879.8376	HHPGINLSHSRPEDER	1879.9038	Cytochrome O ubiquinol oxidase	B
1907.9047	LVDSLFDAAHKYLFGR	1908.0258	Nitrogenase	B
1703.8217	LSAAIQEAYDNFHPK	1703.8156	Nitrogenase	B
1606.8757	GAPADLPARAEALIAR	1606.8792	Nitrogenase	B
1055.5717	QAVQAAIEAR	1055.5724	Nitrogenase	B
1590.8287	LAGLICNSRKCDR	1590.797	Nitrogenase	B
2051.9797	EVLAIEFGLHFPPEVEIR	2052.0681	Thiocyanate hydrolase	P
1466.7396	SASEHTPIETLAR	1466.7366	Thiocyanate hydrolase	P
1466.7396	AQLDPQARQDLAR	1466.759	Cyanase	P
2051.9797	AMNRHEITEQIVLARLR	2052.1084	Cyanase	P
2051.9546	MNRMTLTEQIIETRIR	2052.0457	Cyanase	P
1571.7577	RSAMLSLSACQYR	1571.7549	Nitrilase	P
2051.9797	QFVARGGHLPVDFKGIR	2052.1382	Nitrilase	P
2205.0696	YDKLHMFDTVSESESYR	2205.0049	Nitrilase	P
2512.1206	ARAVENQCYVLAAAQGGKHENGR	2512.2354	Nitrilase	P
1466.7396	MPSEERFNTLAR	1466.6824	Thiosulfate sulfurtransferase	P
1473.6637	SYAWELFCKSR	1473.7075	Nitrilase	P
2051.9797	TLVSTDWLAHLSDPDLR	2052.0276	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	P
1473.6637	FTGTDPEPRPGLR	1473.7212	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	P
2051.9546	RYAGEEEPMEDIKAGHIPR	2051.988	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	P

1621.8147	QVVDARSADRFYGR	1621.7961	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	P
1571.7577	RIVETGESQIADAR	1571.838	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	P
1473.6637	SYAWELFCKSR	1473.7075	Nitrilase	P
1529.7717	VAALQMVSTPELDR	1529.776	Nitrilase	P
2548.3018	MSTFRFALAQFDFPVGATADNAR	2548.2168	Nitrilase	P
2051.9546	EEIATSTIDL DYLDDIR	2051.99	Nitrilase	P
2015.9177	FIAQESRSYVASVSGLMR	2016.0099	Carbon-nitrogen hydrolase	P
1008.4627	TGLIPPQGVK	1008.5968	Nitrilase	P
1843.8407	DSMIGTGLPKRPAEVTR	1843.9462	Nitrilase	P
1466.7396	RRQSAVGPRITAR	1466.8542	NAD ⁺ synthase	P
2548.3018	QFLVGSTTTTMLRTATMPVLLLR	2548.3757	Universal stress protein UspA	P
1466.7396	RDYYIPAEDVAR	1466.7153	Cytochrome O ubiquinol oxidase	P
1538.7407	AAVNDAQAQVAARRR	1538.839	Monooxygenase	P
2015.9177	FRPIFADIAQAVVERER	2016.0905	Monooxygenase	P
1504.6627	VPWESAAGYVDRR	1504.7423	Monooxygenase	P
1466.7396	KRLMDACSVDAR	1466.697	Nitrogenase	P
2051.9797	EEFGVPLYKCNIPMGLR	2052.0173	Nitrogenase	P

Gráfico 01. Proporciones de las proteínas expresadas por especies del género *Alcaligenes* sometidas a 50 ppm de cianuro de sodio. La enzima nitrilasa es la más expresada en este género.

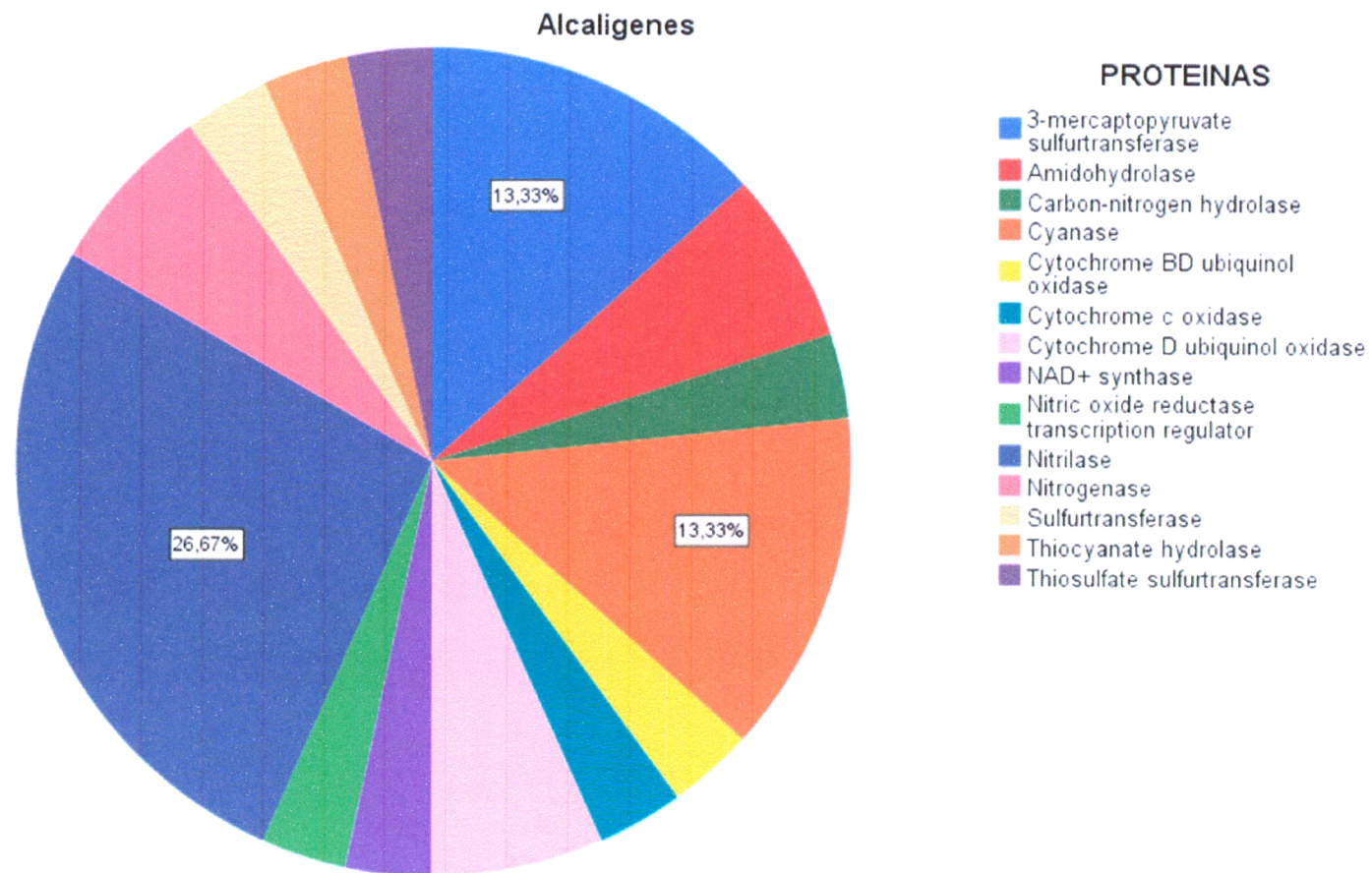


Gráfico 02. Proporciones de las proteínas expresadas por especies del género *Bacillus* sometidas a 50 ppm de cianuro de sodio. La enzima nitrilasa es la más expresada en este género.

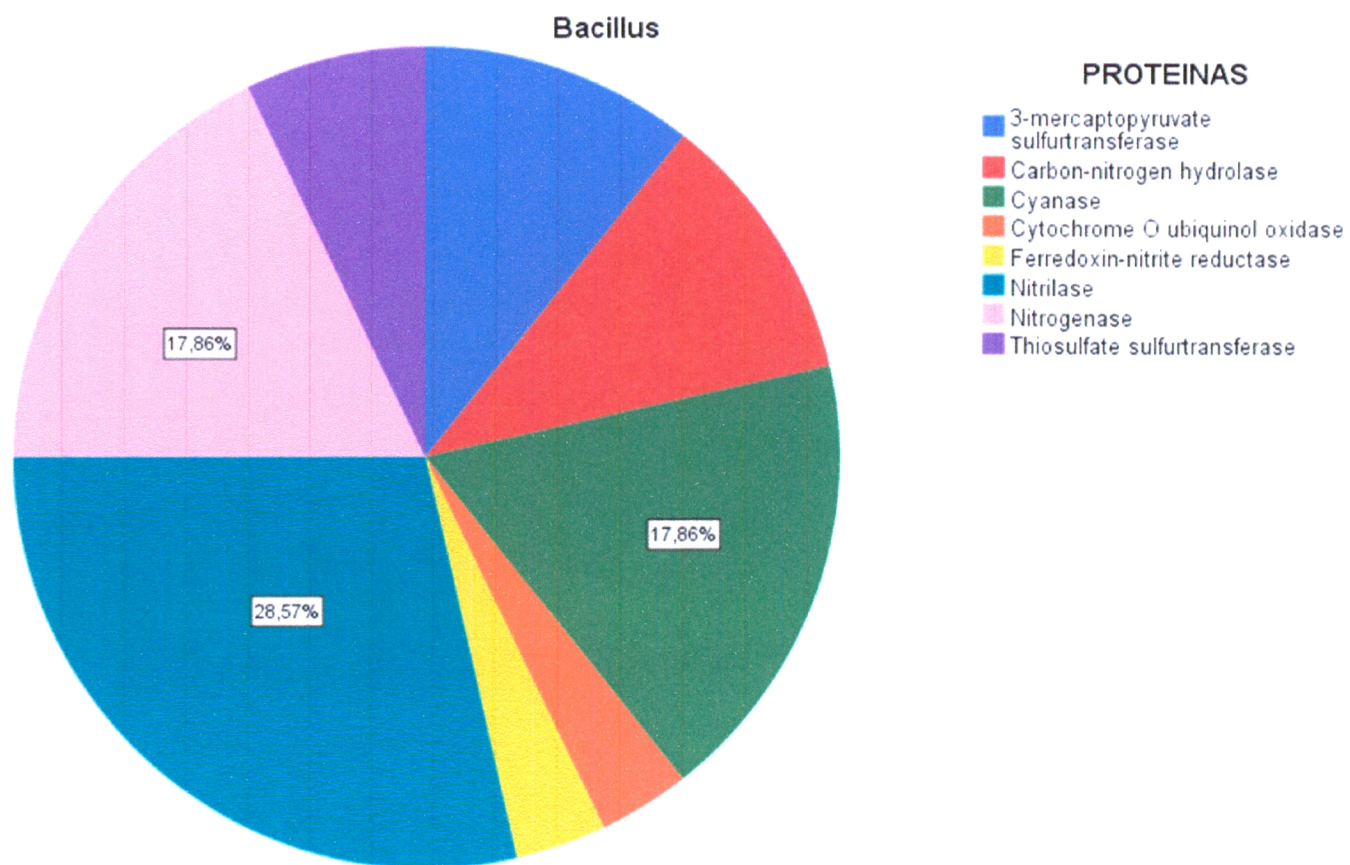


Gráfico 03. Proporciones de las proteínas expresadas por especies del género *Pseudomonas* sometidas a 50 ppm de cianuro de sodio. La enzima nitrilasa es la más expresada en este género.

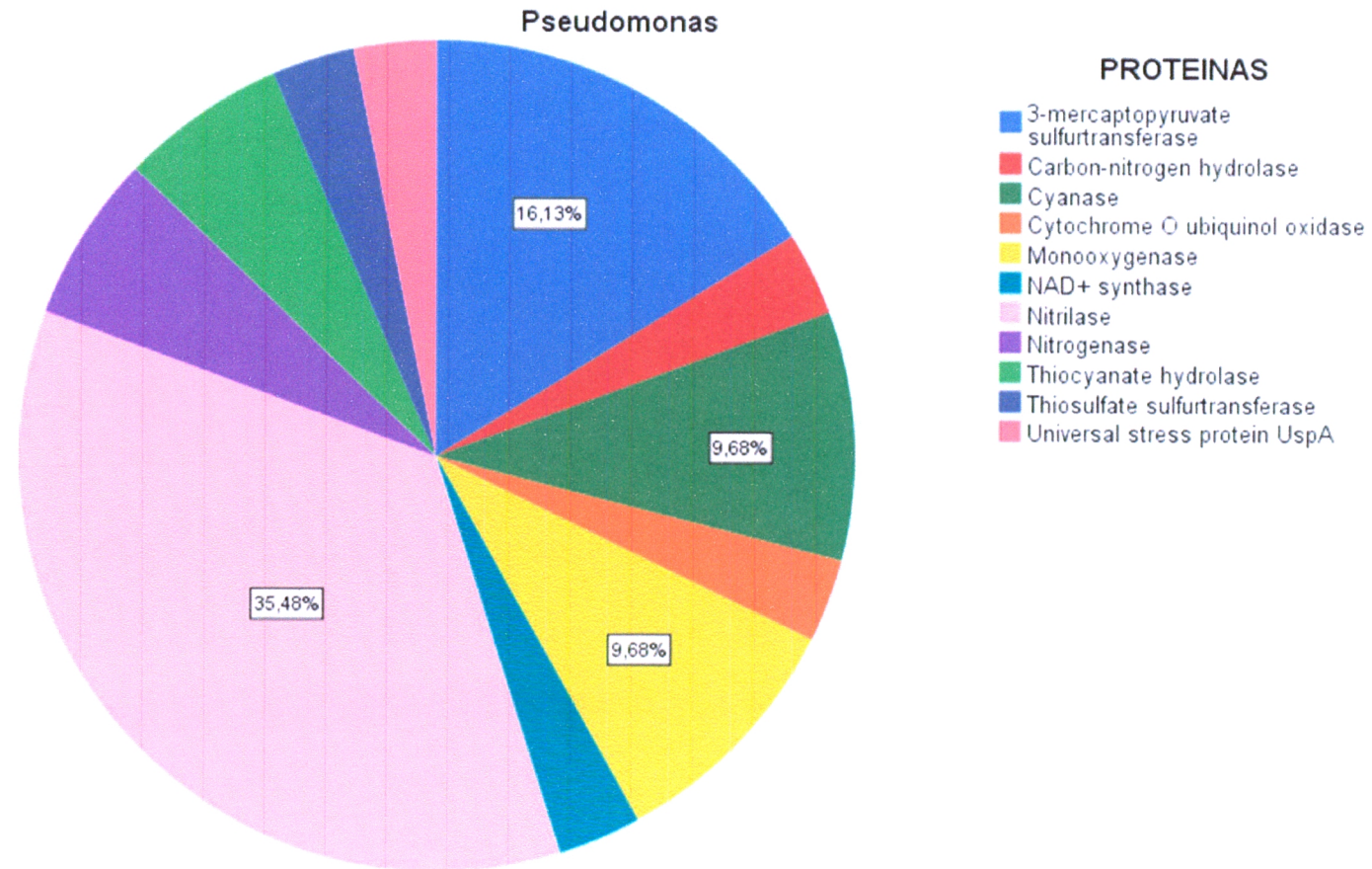


Gráfico 04. Proporciones de las proteínas expresadas por especies de los tres géneros *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Pseudomonas* sometidas a 50 ppm de cianuro de sodio. En los 3 géneros la proteína más expresada fue nitrilasa.

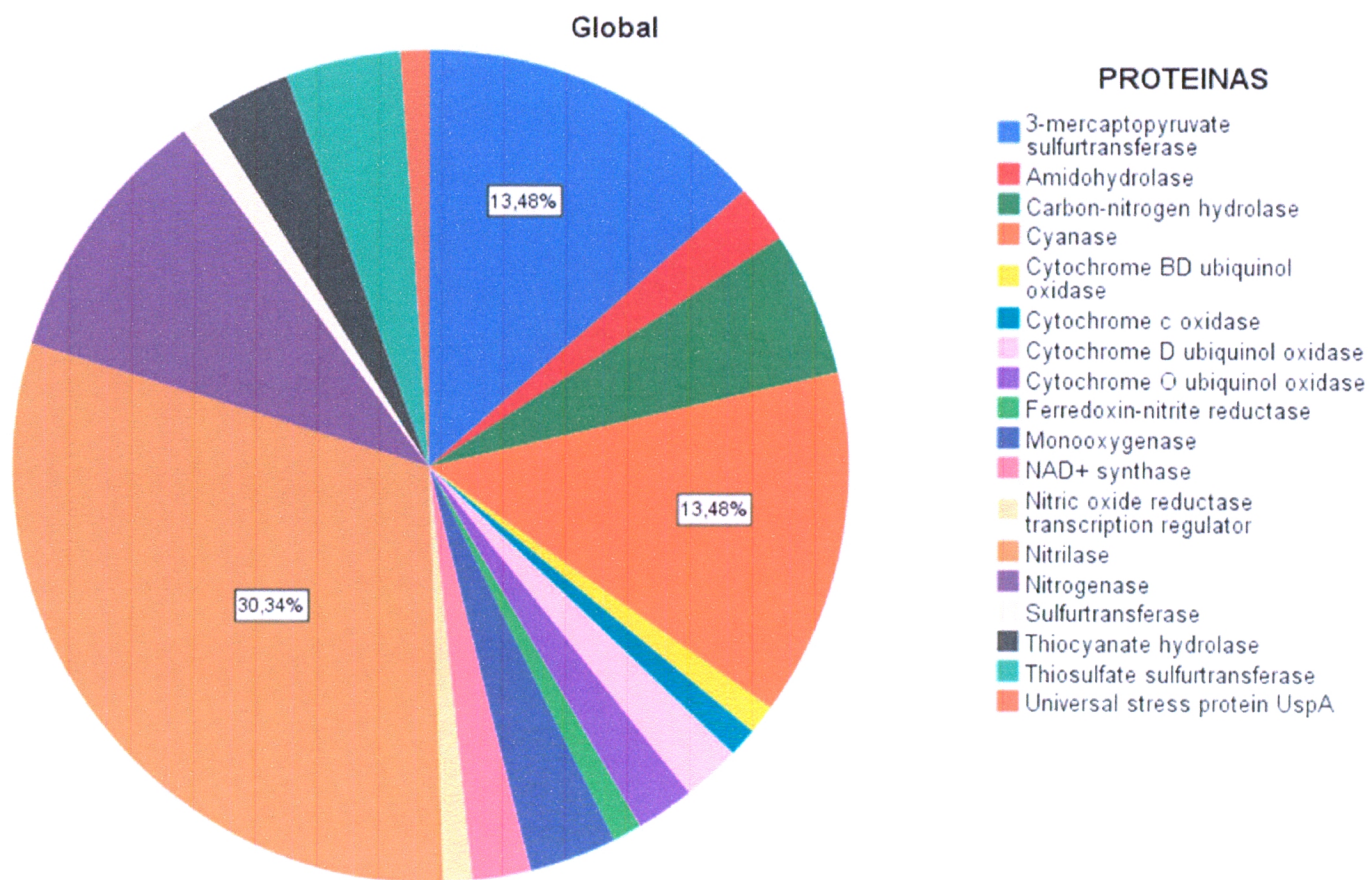


Figura 02. Migración de proteínas en SDS-PAGE 10% a nivel de género, Alcalígenes (A), Bacillus (B), Pseudomonas (P). Control (C). Las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo Luria-Bertani.

Se observan bandas correspondientes a las proteínas intracelulares de las bacterias de los géneros Alcalígenes menos intensas en este caso, Bacillus y Pseudomonas migradas por triplicado en un gel de poliacrilamida, las proteínas se ubican de acuerdo a su peso molecular, las de mayor tamaño migran menos que las más pequeñas. Las bandas son recortadas para luego ser procesadas y finalmente analizadas en el espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF.

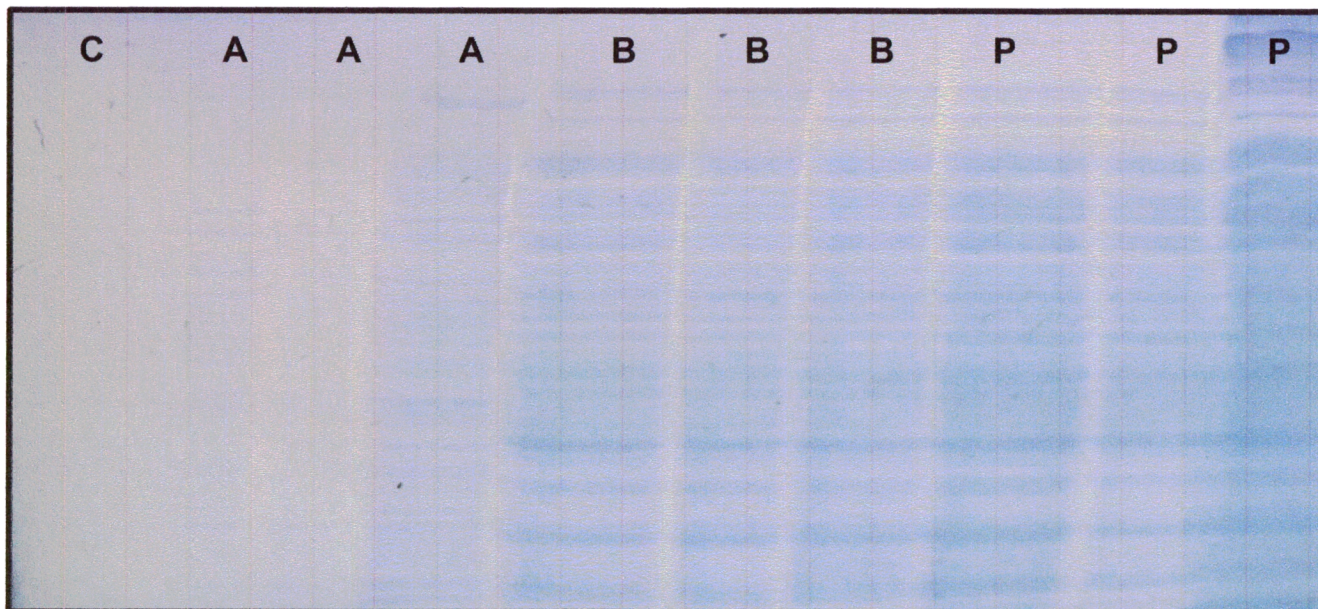


Tabla 02. Resultados de los análisis realizados en el MALDI TOF-TOF a las bacterias cultivadas en caldo nutritivo Luria-Bertani.

Esta tabla muestra las mejores secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas identificadas en el programa bioinformático ProteinPilot y contrastadas en el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Se observa un menor número de proteínas relacionadas con el metabolismo del cianuro y derivados.

Prec MW	Mejor Secuencia	Theor MW	Proteína	G
1156.5907	FEIFVYSPR	1156.5917	Dihydroorotate dehydrogenase	A
1493.7396	QVLTQQYGVESRR	1493.7474	Porin	A
1309.5776	QPTPRGEMASR	1309.6375	Hypothetical protein	A
1075.4166	LAAAVKGQYR	1075.6138	Hypothetical protein	A
1059.4407	IAPQLEAYR	1059.5713	Nitrogenase	A
1059.4667	IAPQLEAYR	1059.5713	Nitrogenase	A
1326.6527	RSPTVLQAIDAR	1326.7256	Chromosome partitioning protein ParA	A
2233.1277	RGVNLIGMTSSYYNGENDAR	2233.0071	Oxidoreductase	A
1326.6337	RSPTVLQAIDAR	1326.7256	Chromosome partitioning protein ParA	A
1309.5776	FNNMNNASVKR	1309.6198	Transcriptional regulator NifA	A
2233.1277	TRAETSEAMESCDIYPAMR	2232.9451	Nitrilase	A
1349.6467	LQAGSFDDNARR	1349.6324	NAD(+) synthase	A
1309.5947	SLTCNELMMAR	1309.6006	Cysteine synthase C1	A
1049.4937	SSALFQELR	1049.5505	Hypothetical protein	A
1326.6527	ALFGPASRFFAR	1326.6833	Multidrug RND transporter	A
1326.6337	ALFGPASRFFAR	1326.6833	Multidrug RND transporter	A
1326.6337	ELLARAEALNAR	1326.7256	Monooxygenase	A
1326.6527	ELLARAEALNAR	1326.7256	Monooxygenase	A

1326.6527	HRKMRASVAER	1326.6938	Nitrilase	A
1326.6337	HRKMRASVAER	1326.6938	Nitrilase	A
1059.4407	MYDAIEYR	1059.4695	Ornithine carbamoyltransferase	A
1065.5297	MAPFIFGQR	1065.543	30S ribosomal protein S2	A
1232.6456	GYRPQFYFR	1232.6091	DNA-directed RNA polymerase	B
1156.5897	FEIFVYSPR	1156.5917	Dihydroorotate dehydrogenase	B
1033.4526	DNFMALAPR	1033.5015	Carboxymethylenebutenolidase	B
1283.5547	WMISEGYGDAR	1283.5604	Aconitase	B
1006.3928	ALEEGEFGR	1006.472	Nitrilase	B
1410.7107	YIVNEIQDVYR	1410.7144	DNA-directed RNA polymerase	B
1473.6866	TNQYGFLESPYR	1473.6888	DNA-directed RNA polymerase	B
1291.6556	MSSANGRNVLAR	1291.6302	50S ribosomal protein L34	P
2362.9016	IGETHEGSATMDWMEQEQR	2362.9795	Elongation factor G	P
2170.0596	SRNVWVVGTEADKDYR	2170.0112	23S rRNA (guanosine(2251)-2'-O)-methyltransferase RlmB	P
1006.3867	VAVCQMAGR	1006.4688	Nitrilase	P
1586.6656	GVLADFGVLPEDTR	1586.8304	Nitrilase	P
1883.8696	DGPLPTPFGGGLITVQFR	1883.9894	Hypothetical protein	P
1006.3867	TQVQRYGR	1006.5308	PAS domain-containing protein	P
1006.3867	VKVFGPLGR	1006.56	Methanesulfonate monooxygenase ferredoxin reductase	P
1883.8696	GLAICYDLRFPEQFR	1883.9352	Nitrilase	P
1883.8696	ALHQLDVGGQSYDYR	1883.8802	Aconitate hydratase	P
1567.7417	DQAHAPIVESFAQR	1567.7743	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	P
2362.9016	LGETHEGSATMDWMEQEQR	2362.9795	Elongation factor G	P
1883.8257	ALHQLDVGGQSYDYR	1883.8802	Aconitate hydratase	P

Gráfico 05. Proporciones de las proteínas expresadas por especies del género *Alcaligenes* cultivadas en caldo nutritivo Luria-Bertani. La enzima nitrilasa es la más expresada junto a una hipotética proteína en este género.

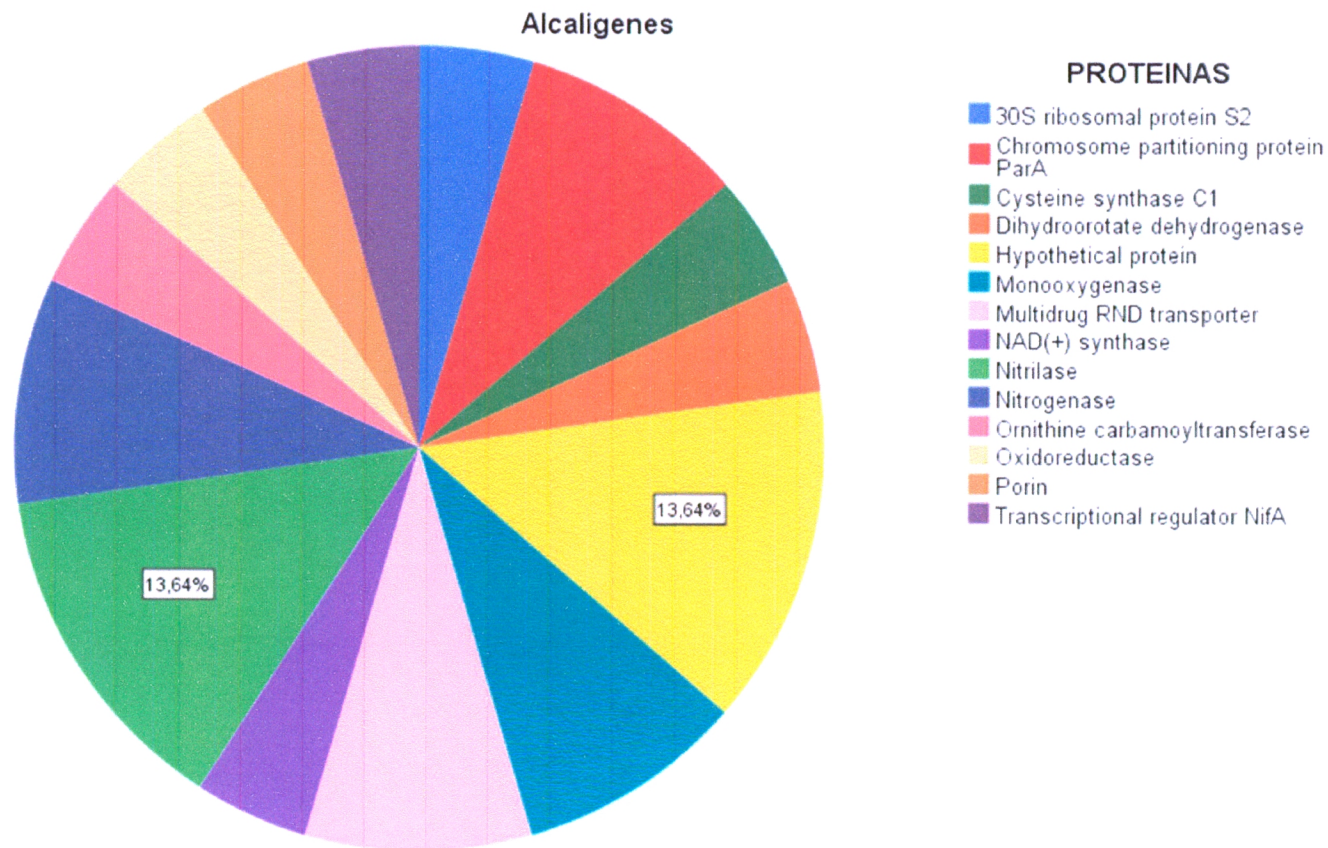


Gráfico 07. Proporciones de las proteínas expresadas por especies del género *Pseudomonas* cultivadas en caldo nutritivo Luria-Bertani. La enzima nitrilase es la más expresada en este género.

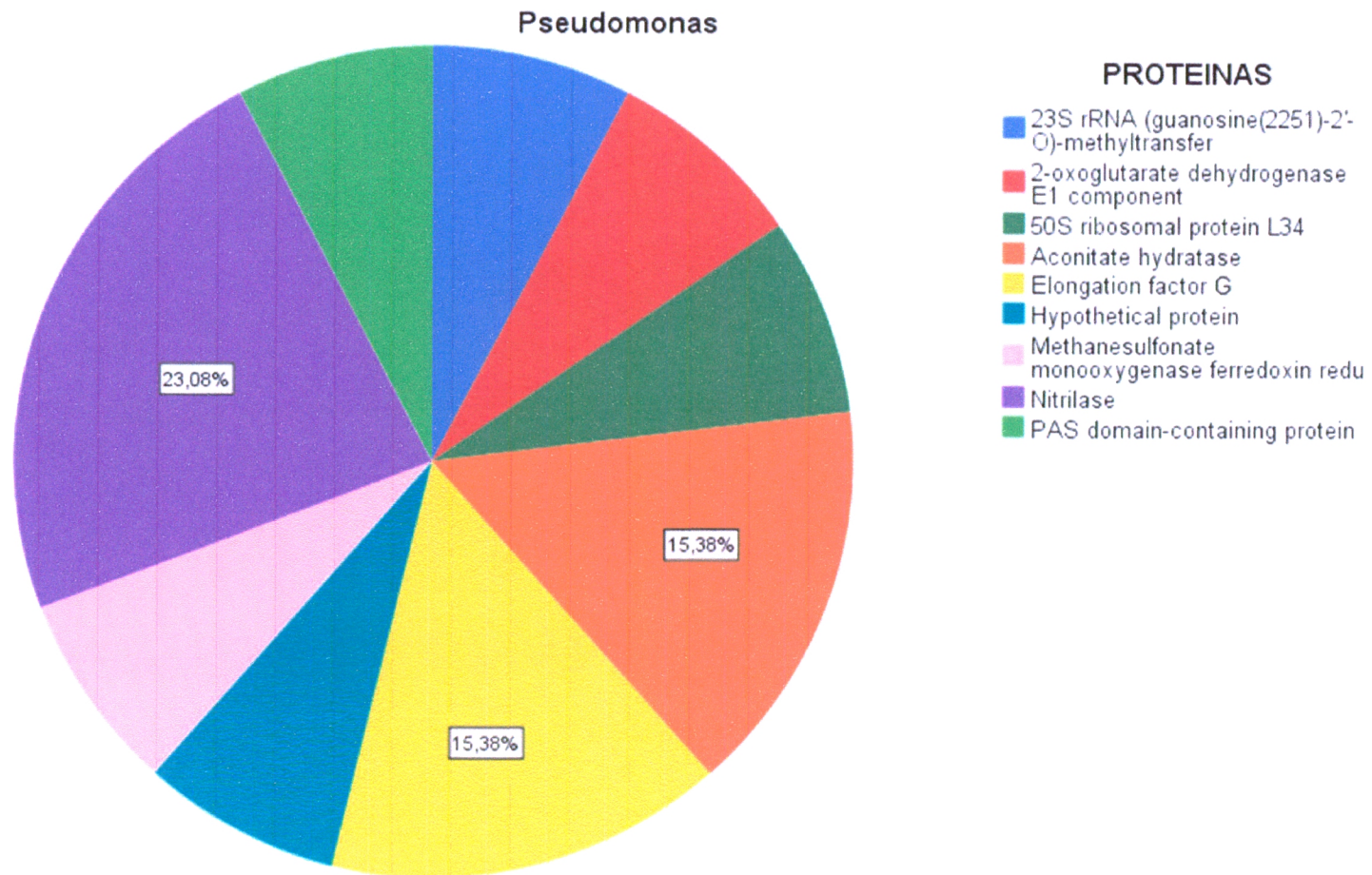
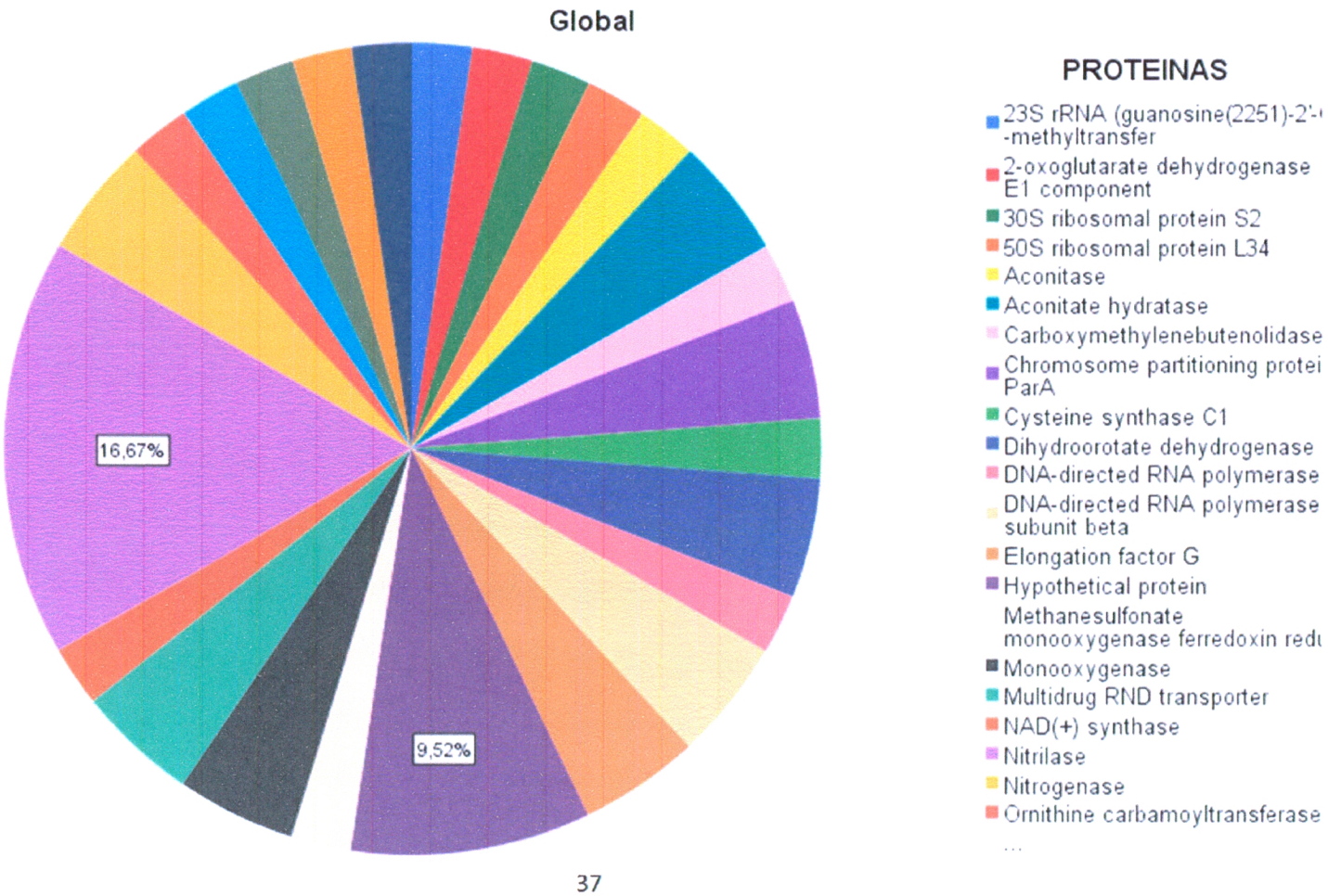


Gráfico 08. Proporciones de las proteínas expresadas por especies de los tres géneros *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Pseudomonas* cultivadas en caldo nutritivo Luria-Bertani. La enzima nitrilase es la más expresada en este género.



4. DISCUSIÓN

La toxicidad del cianuro está relacionada con su capacidad para unirse a cofactores metálicos presentes en muchas metaloproteínas, que se inhiben. Así, el cianuro inhibe el citocromo c oxidasa bloqueando la respiración aeróbica. A pesar de ello, hay una gran variedad de microorganismos capaces de tratar con el cianuro mostrando diferentes rutas de degradación, las cuales conducen a la formación de productos tipo amonio y dióxido de carbono (Ibañez, y otros, 2004). Se cuenta con 32 cepas bacterianas (anexo 01) capaces de tolerar y crecer en cianuro utilizándolo como fuente de nitrógeno, a las cuales se identificó y caracterizó sus proteínas mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF.

Sin embargo, los microorganismos pueden metabolizar el cianuro solo cuando, en adición a las vías de biodegradación para convertir el cianuro en un producto asimilable, también contienen un mecanismo de resistencia al cianuro generalmente una alternativa oxidasa insensible al cianuro y un sistema para tomar el hierro (Fe^{3+}) del medio (sideróforos), ya que Fe^{3+} forma complejos muy estables con el cianuro y no está disponible para el organismo en presencia de cianuro (Huertas & Luque-Almagro, 2006). En este trabajo se identificaron muchas proteínas que participan en las vías de degradación del cianuro y además varios tipos/subunidades de citocromo oxidasa pero no se pudo identificar proteínas relacionadas con la generación de sideróforos muy posiblemente a que estas puedan haber estado en menor cantidad que las demás proteínas expresadas camuflando su presencia.

La degradación microbiana involucra vías enzimáticas y condiciones específicas, como pH, temperatura, concentración de cianuro, etc. La degradación generalmente de cianuro es inducida mediante la presencia de cianuro en el medio y luego la conversión de cianuro en carbón y nitrógeno. Algunas veces más de una vía puede ser utilizada para la biodegradación del cianuro en algunos organismos (Ezzi-Mufaddal & Lynch, 2002). Las cinco vías generales son hidrolítica, oxidativa, reductiva, sustitución/transferencia, síntesis (Kwon, Woo, &

Park, 2002) (Adjei & Ohta, 1999). Las tres primeras vías son de degradación en las cuales las enzimas catalizan la conversión de cianuro en moléculas orgánicas e inorgánicas y posteriormente convertidas a amonio, metano, CO₂, ácido fórmico y ácido carboxílico. Las últimas dos vías son para la asimilación de cianuro en el microbio como fuente de carbono y nitrógeno (Gupta, Balomajumder, & Agarwal, 2010). Las bacterias analizadas demostraron usar 4 de las 5 vías enzimáticas de degradación y asimilación del cianuro en el medio.

Durante la respiración el cianuro bloquea la cadena transportadora de electrones mediante la unión con el ion de hierro en el aceptor de electrón terminal citocromo C oxidasa así rápidamente decrece la tasa de respiración. La síntesis de ATP en mitocondrias es inhibida. En plantas y en varios microorganismos tienen resistencia al envenenamiento con cianuro ya que tienen desarrollado una vía alternativa para la producción de ATP. Algunos de ellos tienen diferentes oxidasas en lugar de la citocromo C oxidasa (Gupta, Balomajumder, & Agarwal, 2010). En las bacterias crecidas en cianuro se identificó varios tipos de oxidasas, pero no la oxida alternativa insensible al cianuro, que es una de las principales oxidasas que le confieren a los microorganismos la resistencia al cianuro.

El cianato es producido en la célula como un producto intermediario en la biosíntesis de aminoácidos y en la naturaleza mediante la espontánea disociación de la urea, un proceso que se conoce desde hace algún tiempo (Walker & Hambly, 1895). Este compuesto es también un componente de los desechos químicos producidos durante la recuperación de oro y otros metales de las minas, debido a la foto-oxidación del cianuro (CN⁻) descargado en embalses de residuo minero (Baxter & Cummings, 2006). La toxicidad del cianato surge a partir de su reactividad con los grupos nucleofílicos en las proteínas (Walsh, Otwinowski, Perrakis, Anderson, & Joachimiak, 2000). Para muchas bacterias, sin embargo, el cianato es un compuesto que puede servir como fuente de nitrógeno, la enzima cianasa identificada en este trabajo cataliza la conversión de cianato a amonio y bicarbonato.

Algunos microorganismos tales como las cianobacterias usan nitrogenasa para fijar el nitrógeno atmosférico. Varias cianobacterias han sido mostradas para mediar la degradación del cianuro mediante la acción de sus nitrogenasas tales como *Rhodopseudomonas gelatinosa* (Materassi, Balloni, & Florenzano, 1977) y *Klebsiella oxytoca* (Kao, Liu, Lou, Lin, & Chen, 2003). La presencia de nitrogenasa fue inducida por cianuro de sodio en el medio como única fuente de nitrógeno en los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, ya que en *Alcaligenes* la expreso tanto en el medio control luria-bertani sin cianuro como en el medio M9 con cianuro.

La degradación del cianuro mediante la hidrólisis esta también catalizada por miembros de la superfamilia de las nitrilasas (Pace & Brenner, 2001) que tienen dos diferentes actividades: cianuro hidratasa y cianuro dihidratasa. La cianuro hidratasa (CHT) convierte cianuro en formamida. Esta se encuentra en numeroso hongos tal como *Neurospora crassa*, *Gloeocercospora sorghi* y *Fusarium lateritium* (Basile, Willson, Sewell, & Benedik, 2008). La cianuro dihidratasa (CynD), algunas veces referida como cianidasa, convierte cianuro en amonio y formato. Esta solo ha sido encontrada en bacterias, notablemente en *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas stutzeri* y *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Jandhyala, Willson, Sewell, & Benedik, 2004). Se identificó la presencia de la enzima nitrilasa en los tres géneros analizados cuando crecieron en medio M9 con 50 ppm NaCN mientras que una menor detección de la enzima fue presenciada en medio nutritivo LB, lo que sigue demostrando que las enzimas nitrilasas son sobrerreguladas en un medio de expresión como el M9 con 50 ppm NaCN pero mantienen una expresión basal otros medios.

3-Mercaptopiruvato sulfurtransferasa en un miembro de la familia de las transferasas. La enzima tiene dos sustratos, el 3-mercaptopiruvato y cianuro, y cataliza su conversión a piruvato y tiocianato (Park, Sewell, & Benedik, 2017). La enzima 3-Mercaptopiruvato sulfurtransferasa fue sobreexpresada en las bacterias crecida en medio con cianuro de sodio, siendo incluso la segunda más abundante.

La remoción biológica de tiocianato ha sido extensivamente estudiada, y varias especies regradadoras de tiocianato tales como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, y *Thiobacillus* han sido identificadas. (Chaudhari & Kodam, 2009) Tiocianato hidrolasa cataliza la degradación y convierte tiocianato a sulfato y su correspondiente amida. Esta enzima pertenece a la familia de hidrolasas, aquellas que actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno distintos de los enlaces peptídicos, específicamente en tiocianato. La tiocianato hidrolasa tiene homologías significativas con las nitrilo-hidratasa bacterianas y convierte el nitrilo en la amida correspondiente, que se hidroliza adicionalmente por la amidasa para formar ácido y amoníaco. La enzima exhibió actividades óptimas a pH 7.5-8.0 y a temperaturas que varían de 30 a 40 °C (Gupta, Balomajumder, & Agarwal, 2010). Se observó la presencia de la enzima Tiocianato hidrolasa en la muestra con exposición a cianuro, ya que este indujo a su expresión.

La cianasa es una enzima inducible presente en varios microorganismos. Esta cataliza la conversión de cianato, el cual a su vez lo convierte a amonio y bicarbonato. La cepa bacteriana *Pseudomonas pseudoalcaligenes* contiene la cianasa que usa cianuro, como única fuente de nitrógeno bajo condiciones alcalinas (Gupta, Balomajumder, & Agarwal, 2010). Al menos tres roles fisiológicos han sido atribuidos a la actividad de la cianasa, ej., la asimilación de nitrógeno, la destoxificación y regulación del metabolismo. Ya que la enzima cataliza la directa formación de amonio a partir de cianato, la actividad de la cianasa permite a algunas bacterias utilizar cianato como fuente de carbono. Todas las bacterias capaces de asimilar cianato tienen actividad cianasa. Esta enzima también ha sido encontrada en cianobacterias y plantas (Luque-Almagro, y otros, 2008). La cianasa fue expresada solo en presencia de cianuro, además fue la segunda proteína más expresada en el medio M9, no fue identificada en medio nutritivo LB.

5. CONCLUSIONES

Se logró la caracterización proteínica donde se identificaron enzimas que participan en la degradación de cianuro tanto en medio nutritivo Luria-Bertani como en Medio mínimo M9 con 50 ppm de cianuro de sodio, siendo este último donde se identificó una mayor cantidad y diversidad de enzimas degradadoras de cianuro y derivados.

Se logró implementar los métodos de extracción de proteínas extracelulares pero no fueron los idóneos para la obtención de la muestra proteica, ya que no se obtuvieron proteínas extracelulares de las bacterias evaluadas, de igual forma las proteínas más representativas de los procesos enzimáticos de biodegradación de cianuro se obtuvieron a partir de las proteínas del interior de las células bacterianas.

Se implementó el enfoque proteómico MALDI TOF/TOF como una notable herramienta para la identificación y caracterización parcial de proteínas bacterianas, proporcionando una metodología rápida y eficiente de análisis.

El kit de extracción de proteínas "Qproteome Bacterial Protein" fue un método adecuado para la obtención de proteínas celulares internas de bacterias degradadoras de cianuro, además que proporcionó las muestras adecuadas para el análisis proteómico mediante MALDI TOF/TOF.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjei, M., & Ohta, Y. (1999). Isolation and characterization of a cyanide utilizing Burkholderia cepacia strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 699-704.
- Aislabie, J., & Atlas, R. (1989). Microbial upgrading of shale oils. Removal of nitriles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 799-810.
- Armengaud, J., Christie-Oleza, J., Clair, G., Malard, V., & Duport, C. (2012). Exoproteomic: exploring the world around biological systems. *Expert Rev. Proteomics*, 561-575.
- Baraúna, R., Ciprandi, A., Santos, A., Carepo, M., Gonçalves, E., Shneider, M., & Silva, A. (2011). Proteomics Analysis of the Effects of Cyanate on Chromobacterium violaceum Metabolism. *Genes*, 736-747.
- Basile, L., Willson, R., Sewell, B., & Benedik, M. (2008). Genome mining of cyanide-degrading nitrilases from filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 427-435.
- Baxter, J., & Cummings, S. (2006). The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1-17.
- Chaudhari, A., & Kodam, K. (2009). Biodegradation of thiocyanate using co-culture of Klebsiella pneumoniae and Ralstonia sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1167-1174.
- Cornejo-La torre, M., Cubas, C., Pretell, K., Arévalo, A., Sernaqué, Y., Liza, V., . . . Mialhe, E. (Enero de 2017). Biorremediación del cianuro mediante el uso de un consorcio microbiano nativo productor de enzimas degradadoras. *MINERIA*(472), 59-71.
- Cuadra, M., Mamani, J., Liñan, A., Andonaire, B., Abanto, C., Hoyos, D., . . . Sánchez, W. (2017). *Anuario Minero 2017*. Lima: Ministerio de Energía y Minas.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., & Henderson, I. (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Cell press*, 139-145.
- Di Girolamo, F., Lante, I., Maurizio, M., & Putignami, L. (2013). The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Current Organic Chemistry*, 2891-2905.
- Dubey, S., & Holmes, D. (1995). Biological Cyanide destrucción mediated by microorganisms. *World J Microbiol Biotech*, 257-265.
- Ebbs, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 231-236.

- Ezzi-Mufaddal, I., & Lynch, J. (2002). Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 1042-1047.
- Finnegan, I., Torien, S., Abbot, L., & Raubenheimer, H. (1991). Precipitation of gold (I) cyanide from dicyano-aurate solutions by *Acinetobacter* RFB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 274-276.
- Gantzer, C., & Maier, W. (1988). Biological degradation of cyanide by nitrogen-fixing cyanobacteria. *Cincinnati: hazardous waste engineering research laboratory*.
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 1-13.
- Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Belgium: WILEY.
- Huertas, M., & Luque-Almagro, V. (2006). Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. *Biochemical Society Transactions*, 152-155.
- Ibañez, C., Pérez, M., Pastorale, C., Granados, P., Keyeux, G., & Pivetta, O. (2004). Correlación entre las mutaciones del gen CFTR y la expectativa de vida de los pacientes fibroquísticos de América Latina. *Actas XXXIII Congreso Argentino de Genética*.
- Ibáñez, M., Cabello, P., Luque-Almagro, V., Sáez, L., Olaya, A., de Medina, V., . . . Roldán, M. (2017). Quantitative proteomic analysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to industrial cyanide-containing wastewaters using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *PloS one*(12).
- Jandhyala, D., Willson, R., Sewell, T., & Benedik, M. (2004). Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS*, 327-335.
- Kao, C., Liu, J., Lou, H., Lin, C., & Chen, S. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* , 1055–1061.
- Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). *Ion Formation from Organic Solids IV*. New York: Wiley.
- Kunz, D., Nagappan, O., Silva-Avalos, J., & Delong, G. (1992). Utilization of cyanide as nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022-2029.
- Kwon, K., Woo, H., & Park, M. (2002). Degradation of tetracyanonickelate (II) by *Cryptococcus humicola* MCN2. *fems microbiology*, 211-216.

ANEXOS

Anexo 01. Listas de las especies evaluadas.

Número	Especies	Codigo
1	<i>Alcaligenes aquatilis</i>	P1CFP B
2	<i>Alcaligenes faecalis strain RW-508</i>	P1CDP
3	<i>Alcaligenes sp.</i>	P1CFP
4	<i>Alcaligenes sp.</i>	S.LIX TGE
5	<i>Bacillus infantis</i>	P1CFP B3 (7)
6	<i>Bacillus subtilis</i>	P1BFP A (2)
7	<i>Bacillus subtilis</i>	P1BDP
8	<i>Bacillus weihenstephanensis KBAB4</i>	P1AFP
9	<i>Bacillus subtilis</i>	P1BFP A(2)
10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	P1AFP
11	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii TU-B-10</i>	P1BFP
12	<i>Bacillus mycoides</i>	P1AFP
13	<i>Bacillus sp. BAB-3423</i>	P1CFP
14	<i>Bacillus subtilis</i>	P1BDP
15	<i>Bacillus infantis</i>	P6DP
16	<i>Bacillus sp. G2DM-52</i>	P1A Agua 10
17	<i>Bacillus sp. G2DM-52</i>	P1A 10-2(1)
18	<i>Bacillus sp.</i>	S reciclado
19	<i>Bacillus sp.</i>	A.lix BA1
20	<i>Pseudomonas fluorescens Pf0-1</i>	P1AFP D1
21	<i>Pseudomonas fluorescens Pf0-1</i>	P1AFP C
22	<i>Pseudomonas putida</i>	P1CDP
23	<i>Pseudomonas putida</i>	P1CDP
24	<i>Pseudomonas sp.</i>	P1BDP
25	<i>Pseudomonas putida</i>	P1CFP
26	<i>Pseudomonas putida NBRC</i>	P1AFP
27	<i>Pseudomonas putida FB-1</i>	P1SLA
28	<i>Pseudomonas sp.</i>	A.lix BR
29	<i>Pseudomonas stutzeri A1501</i>	P1A Agua
30	<i>Pseudomonas sp. f1(2011)</i>	P4PA E
31	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Alix TE
32	<i>Pseudomonas sp.</i>	P1SL

Anexo 02. Composición LB Caldo (Luria-Bertani)

Ingredientes	Gramos/L
Triptona	10
extracto de levadura	5
cloruro de sodio	5
Final pH 7.2 at 32°C	

Anexo 03. Composición de M9 (medio con concentración de cianuro) para un litro.

Compuesto	Concentración
NH ₄ Cl	2 mM
C ₂ H ₃ NaO ₂	50 mM
NaCN	45 ppm
Ajustar pH	9.5-10
Soluciones trazas	1.25 ml

Anexo 04. Protocolo II de recuperación del exoproteoma.

1. Centrifugar los microtubos de 1.5 ml a 10 000 rpm durante 10'.
2. Filtrar el sobrenadante con ayuda de una jeringa de tuberculina.
3. Recuperar el sobrenadante, filtrar a través de un filtro de 0.45 μ m y colocar 500 μ l en un nuevo microtubo.
4. Agregar 2 volúmenes de acetona helada por cada volumen de muestra.
5. Incubar a -20°C por 4 horas.
6. Centrifugar a 14 000 rpm durante 30' y eliminar el sobrenadante.
7. Resuspender en buffer de rehidratación 200 μ l.
8. Centrifugar 12 000 rpm por 10'.
9. Recuperar el sobrenadante.
10. Precipitar con acetona al 10% TCA, 20mM DTT. 2.5 del volumen recuperado.
11. Incubar a -20°C por 12 horas.
12. Centrifugar a 14000 rpm por 20'.

13. Realizar dos lavados con acetona pura, con una centrifugación de 14000 rpm por 5'.
14. Resuspender el pellet en 80 μ l de agua grado HPLC con 0.1% TFA y almacenar a -20°C para futuros estudios.

Anexo 05. Protocolo III de recuperación del exoproteoma.

1. El sobrenadante se obtiene del cultivo bacteriano en fase estacionaria se centrifuga durante 40 minutos y a 20.000 \times g y 4°C.
2. Filtrar el sobrenadante a través de membrana de tamaño de poro 0,22 μ m para eliminar las bacterias residuales.
3. Precipitar el sobrenadante mediante ácido tricloroacético (TCA) preenfriado al 25% (w/v).
4. Incubar la mezcla sobre hielo durante 2 horas y se centrifuga durante 30 min a 40.000 \times g a 4 °C.
5. Los sedimentos se disuelven en acetona fría y se lavan dos veces antes de secado al aire.
6. El pellet de proteína se solubiliza en buffer de lisis (8 M urea, 4% CHAPS, and 2% Pharmalyte pH 4–7) y almacenar a -20°C.

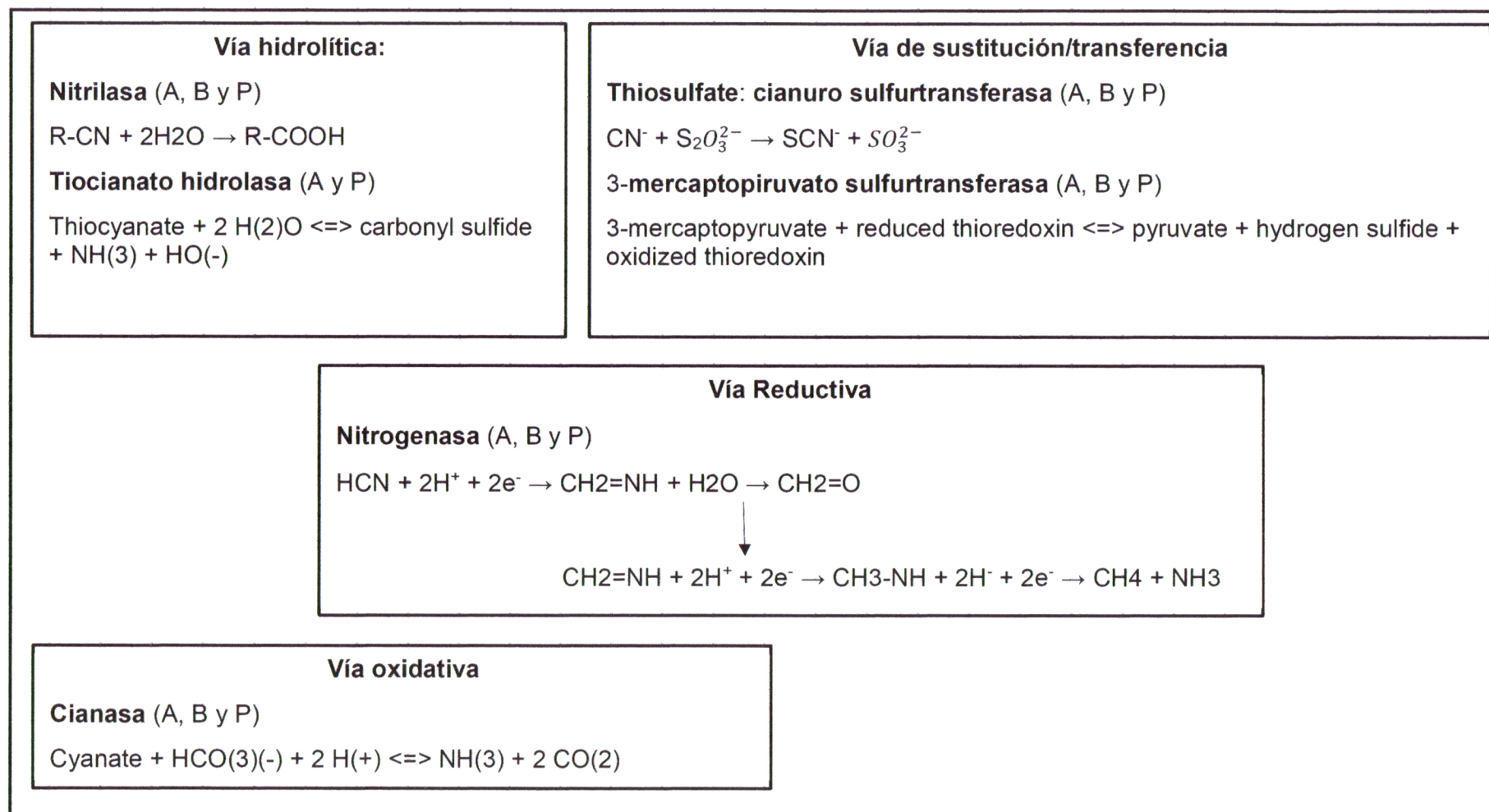
Anexo 06. Protocolo IV de recuperación del exoproteoma.

1. Centrifugar durante 30 min a 20.000 g a 2 °C, la solución sobrenadante se filtra a través de un filtro de membrana de tamaño de 0,45-micras de poro.
2. Precipitar durante la noche con TCA a una concentración final de 12%.
3. centrifugar a 4°C y 10.000 g durante 45 min y el sedimento se lava 3 veces con acetona fría (pre enfriado a -20 °C).
4. Secar a temperatura ambiente durante 2 horas.
5. Resuspender el pellet en solución de lisis (7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% CHAPS and 0.5% Pharmalyte 3–10) y almacenar a -20°C.

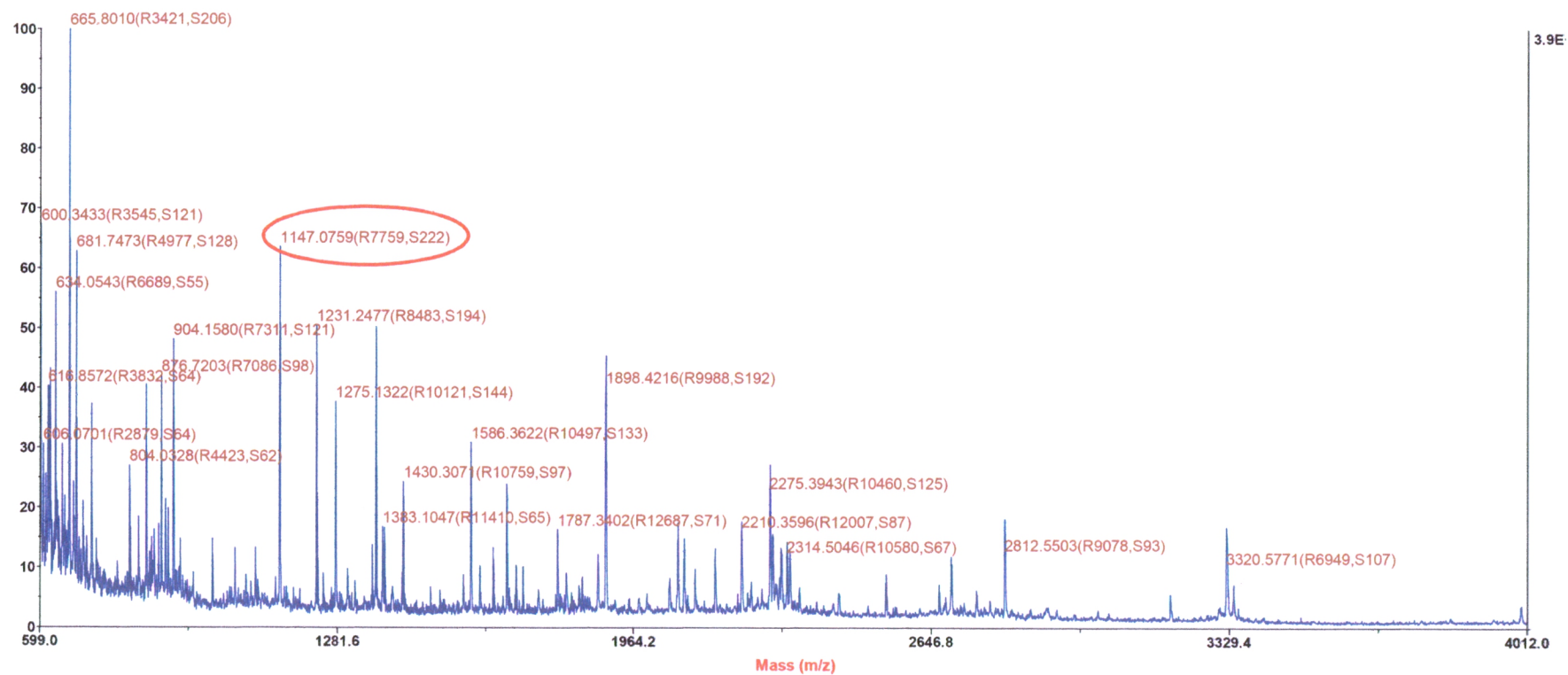
Anexo 07. Protocolo V de recuperación del exoproteoma.

1. Luego de 7 horas de crecimiento las bacterias y los sobrenadantes se recuperan por una centrifugación a 8000 g durante 15 min.
2. Filtrar utilizando un filtro Millex GP (Millipore; Bedford, MA) con un tamaño de poro de 0,22 micras.
3. Las proteínas secretadas en los sobrenadantes de cultivo se precipitan con 50% de etanol.
4. Centrifugar a 13.000 g durante 10 min, los pellets de proteína se guardarán y se descartan los sobrenadantes.
5. Resuspender el pellet con un buffer de lisis que contiene 7 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 120 mM dithiothreitol (DTT), 2% ampholytes (pH 3–10), y 40 mM Tris–HCl, almacenar a -20°C.

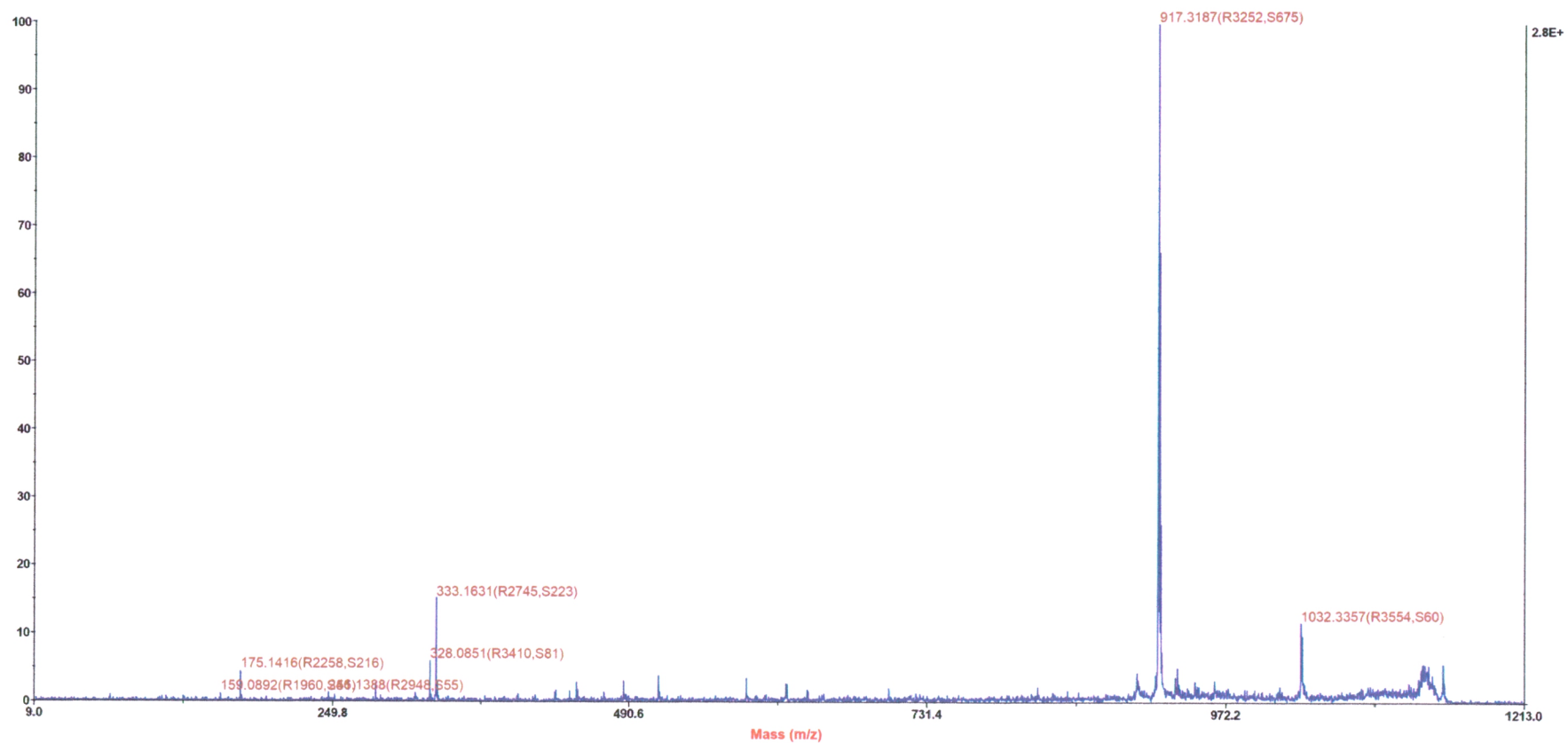
Anexo 10. Rutas de degradación de cianuro y sus derivados en las que intervienen las enzimas identificadas.



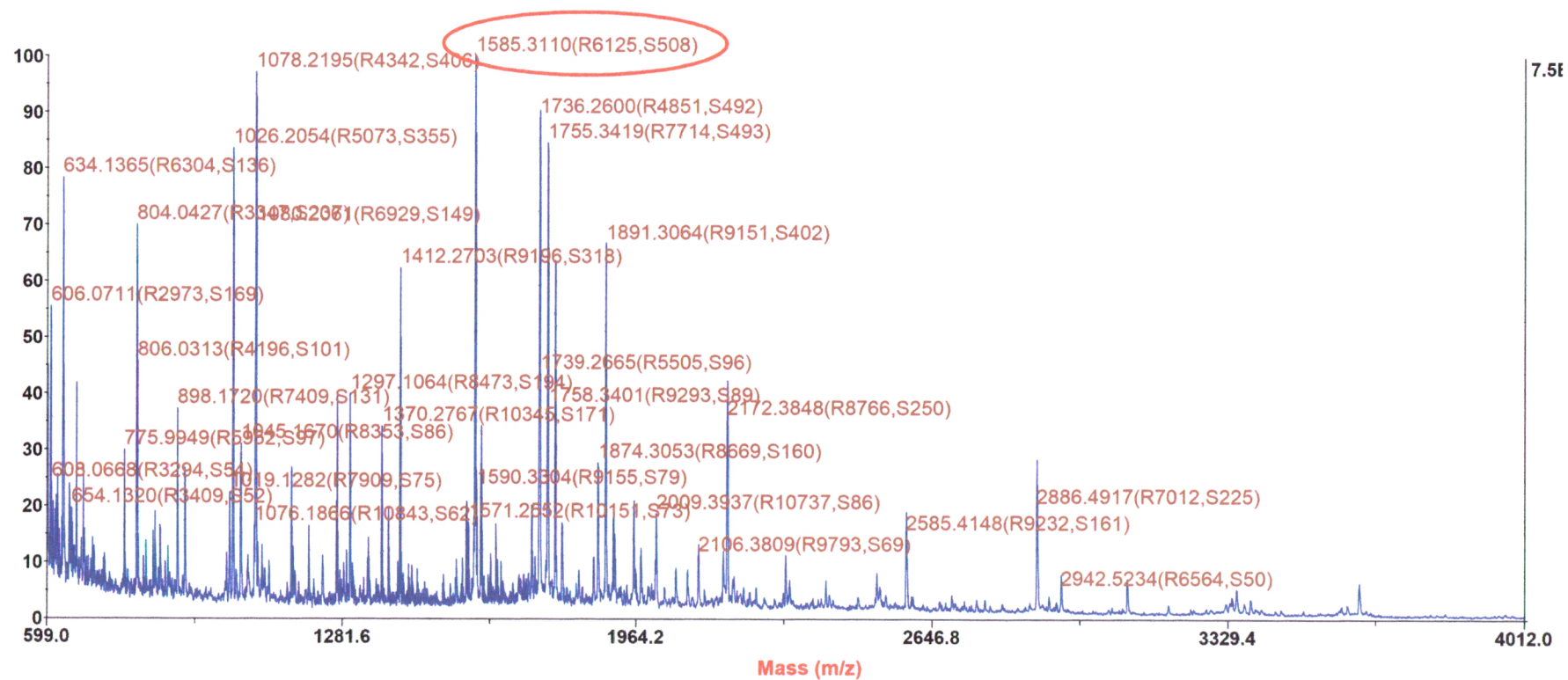
Anexo 11. Espectro MS de proteínas analizadas por MALDI TOF/TOF.



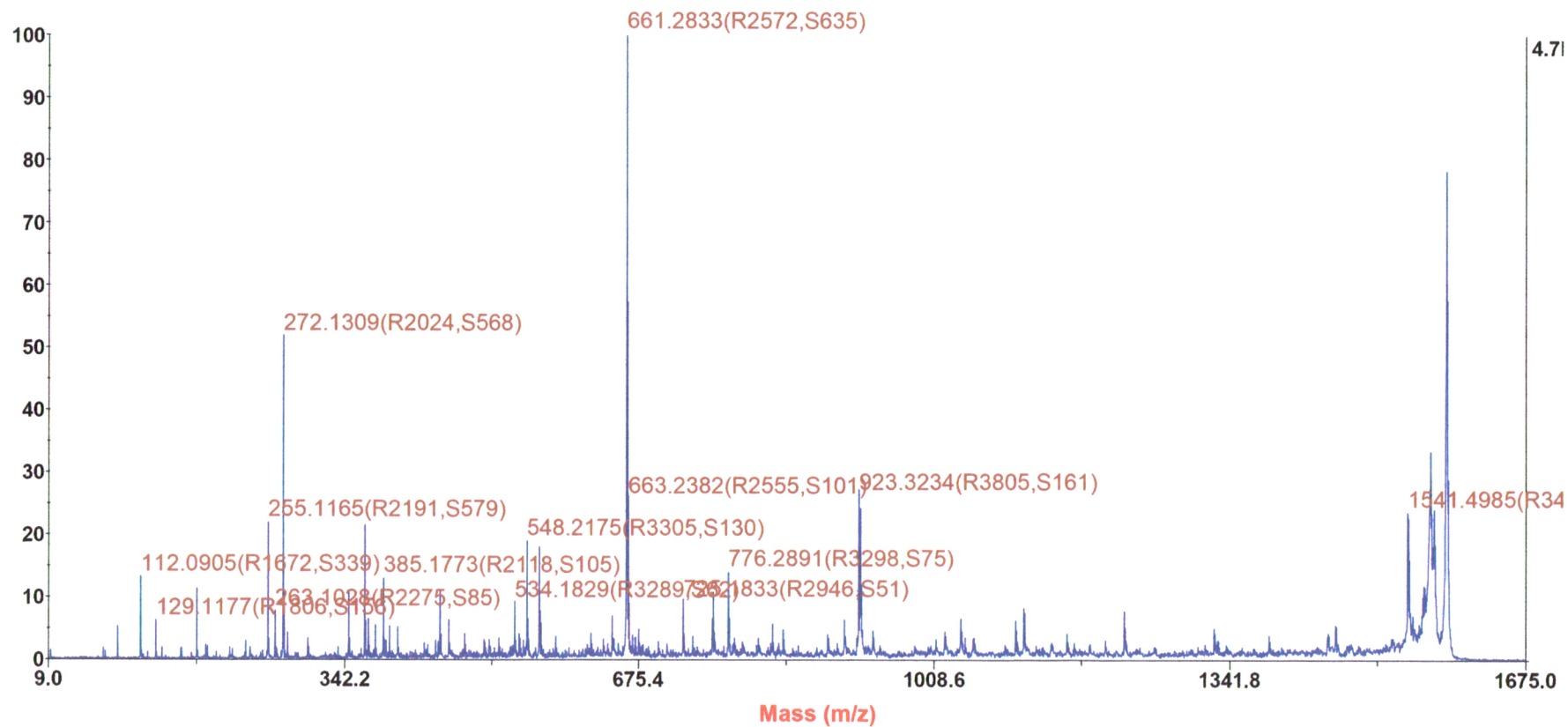
Anexo 12. Espectro MS/MS del pico 1147.0759 de proteínas analizadas por MALDI TOF/TOF.



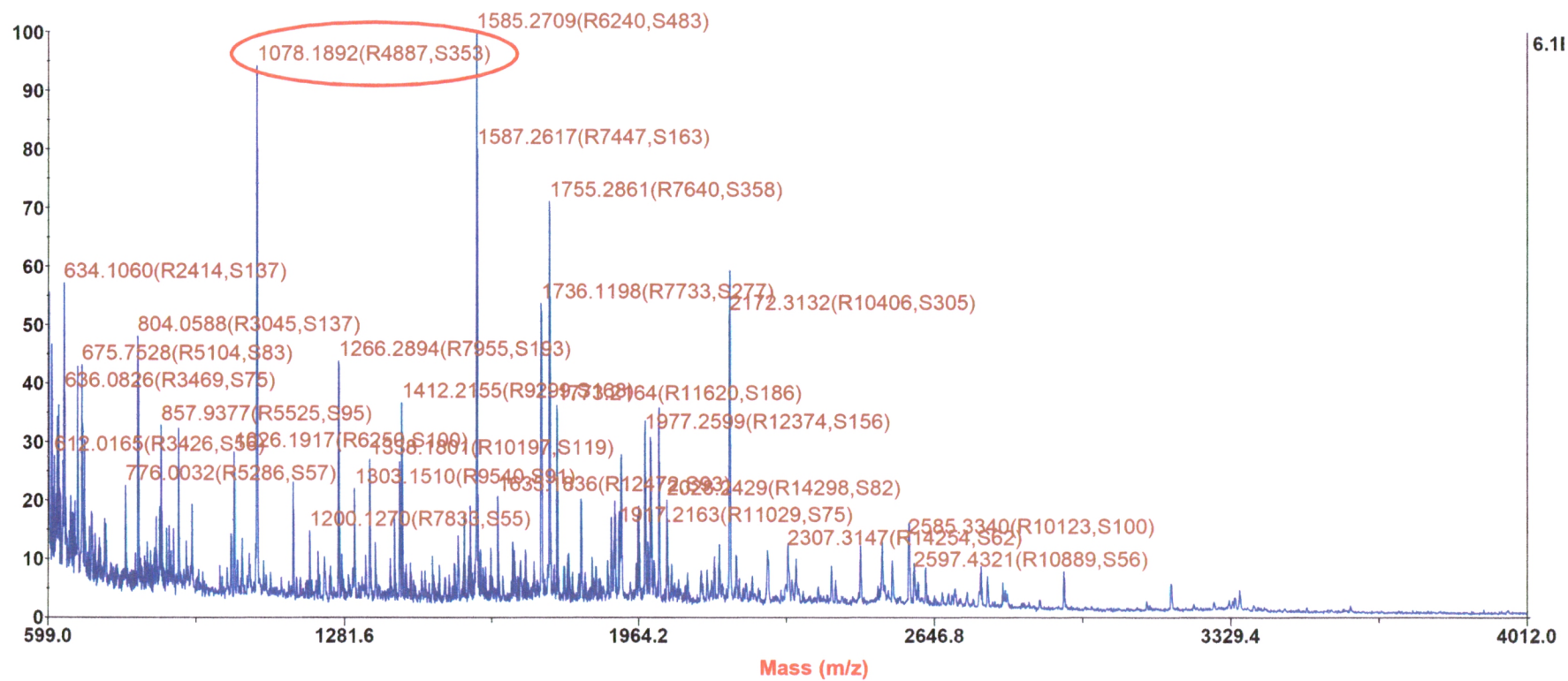
Anexo 13. Espectro MS de proteínas analizadas por MALDI TOF/TOF.



Anexo 14. Espectro MS/MS del pico 1585.3110 de proteínas analizadas por MALDI TOF/TOF.



Anexo 15. Espectro MS de proteínas analizadas por MALDI TOF/TOF.



Anexo 16. Espectro MS/MS del pico 1078.1892 de proteínas analizadas por MALDI TOF/TOF.

